Toulouse

N° d'ordre : 415

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ Paul SABATIER

pour obtenir

le GRADE de DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Pierre GADAL

SUR LE MÉTABOLISME DU CHÊNE ET DE SES ZOOCÉCIDIES. ÉTUDE PARTICULIÈRE DE LA BIOSYNTHÈSE DES ACIDES AMINÉS AROMATIQUES.

Soutenue le 26 Novembre 1970 devant la Commission d'Examen

MM.	A. BRUNEL, Professeur	*Président*
	J. ASSELINEAU, Professeur	*Examinateurs*
	H. DURANTON, Professeur	
Mᵉˡˡᵉ	M. GOAS, Professeur	
M.	J. MEYER, Dr de Recherche	

N° d'ordre : 415

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ Paul SABATIER

pour obtenir

le GRADE de DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Pierre GADAL

SUR LE MÉTABOLISME DU CHÊNE ET DE SES ZOOCÉCIDIES. ÉTUDE PARTICULIÈRE DE LA BIOSYNTHÈSE DES ACIDES AMINÉS AROMATIQUES.

Soutenue le 26 Novembre 1970 devant la Commission d'Examen

MM.	A. BRUNEL, Professeur	*Président*
	J. ASSELINEAU, Professeur	*Examinateurs*
	H. DURANTON, Professeur	
Mᵉˡˡᵉ	M. GOAS, Professeur	
M.	J. MEYER, Dr de Recherche	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

DIRECTION DE L'UNIVERSITE

M. LARENG ..... Président
M. MATHIS ..... 1er Vice-Président
M. MARTIN ..... 2ème Vice-Président
M. MOUNIQ ..... 3ème Vice-Président

HONORARIAT

M. BLAIZOT ..... Doyen honoraire
M. CAPDECOMME ..... Doyen honoraire, Recteur honoraire
M. DELTHEIL ..... Doyen honoraire, Recteur honoraire, Professeur honoraire
M. DUPOUY ..... Membre de l'Institut, Doyen honoraire, Directeur Général du C.N.R.S., Professeur honoraire
M. DURAND ..... Doyen honoraire
M. FOUCHE ..... Professeur honoraire
M. GAUSSENS ..... Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. JACQUES ..... Professeur honoraire
M. MIGNONAC ..... Professeur honoraire
M. MORQUER ..... Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. SECONDAT ..... Professeur honoraire
M. TEISSIE-SOLIER ..... Professeur honoraire
M. VANDEL ..... Professeur honoraire, Membre de l'Institut

PROFESSEURS

M. ESCANDE ..... Mécanique des Fluides, Membre de l'Institut
M. CASTERAS ..... Géologie, Correspondant de l'Institut
M. BEDOS ..... Chimie
M. CAPDECOMME ..... Minéralogie
M. DUPIN ..... Radioélectricité
M. NOUVEL ..... Biologie Générale
M. GALLAIS ..... Chimie, Correspondant de l'Institut
M. DURAND ..... Physique
M. FERT ..... Physique
M. DEIHL ..... Agronomie
M. LESBRE ..... Chimie Organique
M. BRUNEL ..... Physiologie Végétale
M. HURON ..... Mathématiques Appliquées
M. MARGULIS ..... Pédologie
M. TRICHE ..... Chimie Analytique et Spectrographie
M. LEDOUX ..... Zoologie Appliquée
M. RIVALS ..... Agriculture
M. PERRIER ..... Physique
M. MATHIS ..... Chimie
M. ORLIAC ..... Géochimie et Minéralogie
M. LAFOURCADE ..... Physique
M. ANGELIER ..... Zoologie
Melle DE FERRE ..... Botanique
M. FARRAN ..... Minéralogie et Géotechnique
M. LAUDET ..... Physique Théorique et Calcul Numérique
M. SERFATY ..... Biologie Animale
M. NOUGARO ..... Hydraulique Générale et Appliquée
M. LAGASSE ..... Electrotechnique
M. GARDY ..... Génie Chimique
M. BLANC ..... Physique Nucléaire
M. BIREBENT ..... Electronique Appliquée
M. VOIGT ..... Chimie Minérale
M. LEREDDE ..... Botanique
M. LELUBRE ..... Géologie
M. TROCHAIN ..... Botanique
M. MASDUPUY ..... Chimie
M. LALAGUE ..... Mathématiques Générales
M. DESSENS ..... Physique du globe, Correspondant de l'Institut
M. BOUIGUE ..... Astronomie
M. COUCHET ..... Physique
M. LEJEUNE ..... Chimie
M. LASCOMBES ..... Botanique
M. ASSELINEAU ..... Chimie Biologique
M. MAURET ..... Chimie systématique
M. AGID ..... Physiologie
M. MONTANT ..... Cryptogamie
M. GAUTIER ..... Physique
M. CRUMEYROLLE ..... Mathématiques
M. GOURINARD ..... Géologie
M. PULOU ..... Minéralogie
M. CAMBOU ..... Physique Spatiale
M. MIQUEL ..... Chimie
M. LACOSTE ..... Electrotechnique
M. THIBAULT ..... Mécanique Rationnelle et Appliquée
M. MONTEL ..... Chimie Physique et Electrochimie
M. MASCART ..... Mathématiques
M. MEDIONI ..... Psychophysiologie
M. THIRRIOT ..... Hydrodynamique E.N.S.E.I.H.T.
M. BRENON ..... Géologie
M. LAFON ..... Calcul Différentiel et Intégral
M. RAYNAUD P ..... Physiologie Animale
M. ZALTA ..... Chimie Biologique
M. SEVELY ..... Electrotechnique
M. POMMIEZ ..... Mathématiques
M. REY ..... Biologie Végétale
M. COULOMB ..... Physique
M. TRINQUIER ..... Physique
M. MARONI ..... Chimie
M. BEETSCHEN ..... Biologie Générale
M. GRUAT ..... Mécanique des Fluides (hydraulique)
M. DERACHE ..... Physiologie Animale

PROFESSEURS ASSOCIES

M. MANSOUR .....
M. SAKUMA .....

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. HAMANT ..... Botanique
Mme BRUNEL ..... Physiologie Végétale
Melle BERDUCOU ..... Physiologie Végétale
M. PICCA ..... Physique
M. MERIC ..... Mathématiques Appliquées
Mme LECAL ..... Zoologie
M. BUGAREL ..... Génie Chimique
M. MIROUSE ..... Géologie
M. PILOD ..... Physique
M. LARROQUE ..... Physique
M. BARRANS ..... Chimie
Mme LAFON ..... Mathématiques
Melle LAPEYRE ..... Mathématiques (informatique)
M. DAT ..... Mécanique des Fluides
M. JEANNIN ..... Chimie Minérale
M. BERTRAND ..... Chimie
M. SATGE ..... Chimie Organique
M. DESQ ..... Mathématiques
M. MAHENC ..... Chimie
M. LATTES ..... Chimie
M. ROCARD ..... Electronique
M. DEGEILH ..... Physique
M. FALLOT ..... Biologie Végétale (Viticulture et Arboriculture)
M. POILBLANC ..... Chimie
M. TOUZE ..... Physiologie Végétale
M. FRASNAY ..... Mathématiques
M. CASSAGNAU ..... Zoologie
M. GUERIN ..... Mathématiques

MAITRES DE CONFERENCES

M. BLANCHARD ..... Mathématiques
M. HOFFMANN ..... Electronique
M. BITSCH ..... Zoologie
M. FONTAN ..... Physique Nucléaire
M. PESCIA ..... Physique
M. SICARD ..... Biologie Génétique
M. CAUSSINUS ..... Mathématiques Appliquées
M. DE LOTH ..... Chimie Physique
M. MARTY ..... Physique Industrielle
M. BAUDRAS ..... Chimie Biologique
M. DURAND Ph..... Physique
M. LEFEUVRE ..... Electronique E.N.S.E.I.H.T.
M. SOUQUET ..... Géologie
M. SAPORTE ..... Physique
M. ATTEIA ..... Mathématiques
M. ENJALBERT ..... Chimie
M. IMBERT ..... Psychophysiologie
M. SCHNEIDER ..... Biologie Cellulaire
M. ANGELINO ..... Génie Chimique
M. DABOSI ..... E.N.S.C.
M. ETTINGER ..... Mathématiques
M. CALVET ..... Mécanique des Fluides (E.N.S.E.I.H.T.)
M. PAGANI ..... Physique
M. CUPPENS ..... Mathématiques
M. MATHIEU ..... Chimie Analytique
M. TRANNOY ..... Physique (E.N.S.E.I.H.T.)
M. CASTAGNETTO ..... Mathématiques (E.N.S.E.I.H.T.)
M. GILOT ..... Génie Chimique (Institut du Génie Chimique)

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

M. PUN .....
M. PARKS .....

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. BEAUFILS ..... Informatiques
M. DARROZES ..... Mécanique
Melle BARBANCE ..... Mathématiques

PERSONNEL DE LA FACULTE AFFECTE A L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE

PROFESSEURS

M. ROQUES ..... Chimie Industrielle

M. GRATELOUP ..... Génie Electrique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. CASSIGNOL ..... Génie Electrique

M. COLLETTE ..... Physique

M. MASO ..... Génie Civil

MAITRES DE CONFERENCES

M. FAGET ..... Physique

M. TRUCHASSON ..... Mécanique

M. SCHUTTLER ..... Physique

M. MIRA ..... Génie Electrique

M. LETURCQ ..... Génie Electrique

M. SIRIEYS ..... Génie Civil

M. DURAND G ..... Chimie

M. CARRARA ..... Physique

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. VERDIER ..... Chimie

PERSONNEL AFFECTE A L'INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE DE TOULOUSE

MAITRES DE CONFERENCES

M. MARTIN ..... Génie Electrique

M. PERENNOU ..... Informatique

M. THENOZ ..... Minéralogie

CHARGE D'ENSEIGNEMENT

M. REY ..... Génie Electrique

ADMINISTRATION

M. PRINEAU ..... Conseiller Administratif des Services Universitaires.

A MES PARENTS

A MA FEMME

A MES ENFANTS

A TOUTE MA FAMILLE

en Hommage affectueux

Le travail qui fait l'objet de cette thèse a été réalisé, au Centre de Physiologie Végétale de l'Université Paul SABATIER de Toulouse, sous la direction de Monsieur le Professeur A. BRUNEL. En cette occasion, je suis très heureux de lui exprimer ma profonde reconnaissance pour les conseils, les encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer, pour les moyens qu'il a mis à ma disposition et pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée. Je le prie de trouver ici l'expression de ma sincère gratitude et de mon entier dévouement.

J'associe à cet hommage Madame BRUNEL-CAPELLE et je la remercie particulièrement pour l'aide précieuse qu'elle m'a fournie au cours de la rédaction du manuscrit.

Monsieur ASSELINEAU, Professeur, s'est toujours intéressé à la progression de ce travail ; il m'a toujours très bien accueilli dans son laboratoire. Je suis sensible à l'honneur qu'il me fait en acceptant de participer à mon jury.

Monsieur H. DURANTON, Professeur à la Faculté des Sciences de Strasbourg a accepté de juger ce travail, qu'il trouve ici l'assurance de ma respectueuse gratitude.

A la fin de ma licence, Mesdemoiselles M. et G. GOAS, Professeurs à la Faculté des Sciences de Rennes, m'ont orienté vers le service de Monsieur BRUNEL ; elles ont ensuite suivi attentivement l'évolution de mes recherches, qu'elles trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude. Je suis particulièrement reconnaissant à Mademoiselle M. GOAS d'avoir bien voulu accepter de faire partie de mon jury.

Monsieur J. MEYER, Directeur de Recherches au CNRS, m'a fait l'honneur de publier deux articles dans la revue "MARCELLIA" puis d'accepter d'examiner cette thèse ; qu'il veuille bien agréer l'expression de ma reconnaissance.

Avec mon ami A. BOUDET, j'ai eu des échanges de vue quotidiens, je tiens à le remercier pour ses pertinents conseils et ses amicales critiques.

Madame H. BOUYSSOU et Monsieur BARTHE ont collaboré étroitement à la réalisation de ce travail, je les en remercie vivement.

Que tous mes autres collègues du Centre de Physiologie Végétale et particulièrement Mademoiselle BALDY, Messieurs CAVALIÉ, LATCHÉ, ALIBERT, MARIGO et PIQUEMAL que j'ai maintes fois importunés soient ici remerciés de leur amical concours.

Enfin, je ne saurais oublier le personnel technique et surtout Mesdames ROUSSILHES, VIALLELE, CAPDIVILA, ARQUIER, BOUDET, GRAZIANA et BAILLY, Messieurs DUPONT et ORLEAC ; leur dévouement pour des tâches souvent ingrates a grandement contribué à la réalisation de ce travail.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543906_0030

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION 1

MATERIEL ET METHODES 5

PREMIERE PARTIE

CONSTITUTION ET METABOLISME DU CHENE ET DES GALLES

CHAPITRE I.- CONSTITUTION AZOTEE DE Quercus pedunculata

A.- Variations annuelles des composés azotés dans les feuilles 31

B.- Constitution azotée des jeunes Chênes 36

CHAPITRE II.- DONNEES SUR LA CONSTITUTION DES GALLES

A.- Matériel végétal 52

B.- Teneurs en eau 52

C.- Résidus d'extraction 53

D.- Glucides solubles 54

E.- Acides organiques 55

F.- Constituants azotés 58

G.- Acides phénoliques 73

H.- Conclusions 76

CHAPITRE III.- ETUDE DE QUELQUES ASPECTS DU METABOLISME DU CHENE ET DES GALLES

A.- Devenir du glucose $U^{14}C$ 81

B.- Synthèse protéique 88

C.- Conclusions 91

DEUXIEME PARTIE

BIOSYNTHESE DE LA TYROSINE ET DE LA PHENYLALANINE CHEZ LE CHENE ET SES GALLES. MECANISMES DE REGULATION

INTRODUCTION 95

CHAPITRE I.- MISE EN EVIDENCE DE LA VOIE DE L'ACIDE SHIKIMIQUE DANS LES GALLES

A.- Incorporation de la radioactivité de l'acide shikimique dans les acides aminés 101

B.- Comparaison des activités spécifiques 102

C.- Conclusions 104

CHAPITRE II.- LA CHORISMATE-MUTASE

A.- Formation de la tyrosine et de la phénylalanine à partir des acides chorismique et prephénique 109

B.- Etude de la chorismate-mutase 110

CHAPITRE III.- LA TRANSAMINASE DES ACIDES AMINES AROMATIQUES

A.- Matériel et méthodes 132

B.- La transaminase des acides aminés aromatiques chez le Chêne et ses galles 138

CONCLUSIONS GENERALES 171

BIBLIOGRAPHIE 177

ABBREVIATIONS 190

INTRODUCTION

Les curieuses déformations induites sur les végétaux par l'action des insectes gallicoles attirèrent l'attention dès la plus haute antiquité. Les premières descriptions de cécidies nous sont fournies par THEOPHRASTE (IVème - IIIème siècles av. J.C), et au cours des siècles suivants, l'intérêt pour ces formations pathologiques fut justifié par leur multiples usages : teinture des vêtements, fabrication de l'encre, tannage des peaux, traitement de certaines maladies,...

Au même titre que les fruits, ces excroissances furent longtemps considérées comme des productions normales des arbres, la présence d'insectes en leur sein étant diversement interprétée au cours des âges. C'est MALPIGHI, en 1675, qui établit la relation de cause à effet entre l'insecte et sa galle. Cette découverte, point de départ de la cécidologie, ouvrit un vaste champ d'investigations axées sur la description, l'identification et la classification des galles et de leurs insectes initiateurs.

Aux premiers travaux, uniquement descriptifs, succédèrent des recherches plus rigoureuses qui s'orientèrent progressivement vers une classification rationnelle des galles et des insectes cécidogènes, grâce aux remarquables mises au point de HARTIG (1843), de MAYR (1876), et de KUSTER (1903). Ces travaux, menés surtout activement au cours de la seconde moitié du XIXème siècle, ont permis d'identifier plus de 15 000 agents cécidogènes végétaux (cécidophytes) ou animaux (cécidozoaires).

Les cécidophytes appartiennent surtout aux bactéries, aux champignons et aux algues, et la phytocécidie la mieux connue est la tumeur appelée "Crown-gall" induite par la bactérie Agrobacterium tumefaciens sur un grand nombre de Dicotylédones.

Les cécidozoaires se recrutent parmi les Nématodes, les Acariens, mais les cécidies les mieux organisées et les plus caractéristiques sont dues à des insectes tels les Thysanoptères, les Hémiptères, les Coléoptères, les Diptères et surtout les Hyménoptères (MANI, 1964).

Ces agents induisent des galles sur des plantes d'origines très différentes (HOUARD, 1908). La fréquence des cécidies est toutefois très inégale selon le groupe systématique considéré : 98 % d'entre elles se développent sur les Angiospermes et sur les 14 750 galles identifiées dans ce sous-embranchement, 93 % se rencontrent chez les Dicotylédones. De plus, dans cette classe, la répartition diffère selon les ordres, les familles et les genres ; les Fagales en Europe, portent 50 % des galles et, dans cet ordre, le genre Quercus est particulièrement parasité.

En même temps que s'effectuait la recherche de nouvelles cécidies, les études réalisées sur leurs structures anatomiques, histologiques et sur leur cytologie, mirent en évidence non seulement les originalités des tissus cécidiens mais encore les grandes différences existant entre les galles selon la nature de l'agent inducteur et du végétal attaqué (GARRIGUES, 1951). Les cécidies provoquées par les Acariens ou les Homoptères sont les plus simples ; elles sont constituées le plus souvent d'un

seul type de tissu sans différenciation nette. Au contraire, les galles d'insectes plus évolués (Diptères, Hyménoptères Cynipides) possèdent une organisation remarquable, centrée sur le parasite.

Le problème de l'induction cécidogène préoccupa déjà MALPIGHI qui supposa l'intervention d'un "liquide spécial" introduit par l'insecte dans la plante lors de la ponte. Cette hypothèse fut abandonnée par REAUMUR (1737) au profit d'une théorie purement mécanique. Mais, depuis les travaux de LACAZE-DUTHIERS(1853), l'explication de l'excès de croissance par une substance chimique sécrétée par le parasite est universellement admise. La réalité de l'action d'une telle substance fut clairement démontrée par MOLLIARD en 1917. Néanmoins, malgré le grand nombre d'études entreprises depuis lors (BECK, 1946 ; NYSTERAKIS, 1946 ; TAYLOR, 1949 ; ANDERS, 1958 ; LEWIS et WALTON, 1958), la nature des substances chimiques responsables des hypertrophies et hyperplasies cécidiennes demeure controversée.

Les investigations les plus approfondies sur la constitution des galles datent des recherches de MOLLIARD (1913). Par l'étude d'un nombre élevé de cécidies d'origines différentes, cet auteur put dégager des caractéristiques communes à tous les tissus cécidiens et montrer l'analogie de leur constitution avec celle des fruits et des organes dépourvus de chlorophylle. Exception faite des travaux de HILDEBRANDT et de son école (ARYA et al., 1962 ; WARICK et HILDEBRANDT, 1966 et 1967) sur des cultures de tissus provenant de galles de Phylloxera, les autres études effectuées sur ces productions anormales se limitent à des aspects particuliers de leur composition chimique (KIEFFER, 1897 ; MONTANT, 1960 ; KIENTZLER et al., 1962 ; PACLT et HASSLER, 1967) ou de leur équipement enzymatique (COSENS, 1912 ; MOLLIARD, 1913, BRONNER, 1969).

Ce bref aperçu des principales orientations de la cécidologie met en lumière l'étendue et l'importance des données acquises sur la nature des agents cécidogènes, l'induction, la formation et l'organisation interne des galles ; mais il fait ressortir que par rapport à ces différents domaines, nos connaissances sur la biochimie des tissus gallaires demeurent encore très limitées. Pourtant, le développement, à partir de quelques cellules, d'une entité structurale entièrement différente de la plante-hôte constitue, dans le domaine de la pathologie végétale, un cas privilégié permettant d'étudier, en l'absence de l'agent inducteur, les déviations métaboliques engendrées par une attaque parasitaire.

J'ai donc tenté d'apporter des indications nouvelles sur la constitution chimique et les potentialités métaboliques de ces productions pathologiques. Pour ce faire, j'ai retenu comme matériel d'étude les galles induites par les Hyménoptères Cynipides sur les espèces du genre Quercus. Quatre raisons ont motivé ce choix :

- ces cécidies constituent, par suite de leur stricte organisation interne, les galles les plus évoluées en Europe (MANI, 1964),
- elles n'ont fait l'objet que d'un nombre très limité d'investigations d'ordre biochimique,
- par leur très grande abondance sur le Chêne (on a dénombré plus de 200 espèces différentes sur le seul Chêne rouvre), elles constituent un cas favorable à l'étude de la spécificité d'action de chaque agent pathogène,

- enfin, en plus de ces caractéristiques, les galles induites par les Cynipides sur le Chêne ont également été retenues en raison de l'intérêt que suscite leur plante-hôte.

En effet, dans la zone tempérée, le Chêne constitue l'espèce dominante de nombreuses forêts dans lesquelles il se signale par sa vigueur, par l'ampleur et la majesté de son développement. Son grand rôle économique dû à la diversité de ses productions : bois, liège, tannins,... attira dès la fin du XIXème siècle l'attention des chercheurs ; leurs travaux, encore poursuivis de nos jours, ont permis d'approfondir de nombreux aspects de la biologie, de l'écologie, ou de la pathologie de cet arbre.

Dans le domaine de la physiologie, les principales investigations portent sur la caractéristique la plus anciennement connue de ce végétal : sa faculté de synthétiser et d'accumuler un grand nombre de substances phénoliques. Depuis près d'un siècle, cet aspect particulier de son métabolisme a été examiné sous des angles très divers parmi lesquels : l'identification (FREUDENBERG, 1920 ; CAMUS, 1938 ; KALRA et al., 1966 ; MARIGO et ALIBERT, 1969), l'étude de la biosynthèse (HATHWAY, 1958) ou encore de la répartition des composés aromatiques dans les différents organes de la plante (FEENY et BOSTOCK, 1968).

Les autres études sur le Chêne concernent, en premier lieu, son métabolisme azoté (COMBES, 1926 ; SAMPSON et SAMISCH, 1935 ; LUND et SANDSTROM, 1943 ; WOODS et al., 1959 ; BOUYSSOU et al., 1967) mais aussi l'identification des cyclitols (KINDL et al., 1967), des quinones biologiques (HINDBERG et DAM, 1965), et des régulateurs de croissance (MICHALSKY, 1969) qu'il renferme.

Les résultats de ces travaux, malgré les précieuses indications qu'ils fournissent sur la physiologie ou la biochimie du Chêne, se révèlent néanmoins trop fragmentaires pour permettre d'aborder, avec une connaissance suffisamment approfondie de la plante-hôte, l'étude de l'action des insectes gallicoles sur ce végétal. Dans ce travail, j'ai donc été amené le plus souvent à examiner d'abord la constitution chimique ou le contenu enzymatique de la plante-hôte, puis à étudier ces mêmes caractéristiques chez les galles.

Dans la première partie, essentiellement analytique, j'ai successivement :

- déterminé les particularités de la composition azotée du Chêne,
- analysé, en rapport avec les organes sains ou parasités, quatre galles induites sur ce végétal par des Cynipides d'espèces différentes,
- recherché l'origine de certains métabolites dont l'accumulation caractérise les tissus gallaires.

Parmi les différentes possibilités de recherche qui s'offraient j'ai ensuite choisi d'étudier, dans la seconde partie, la biosynthèse de la tyrosine et de la phénylalanine ; en effet, ces composés aromatiques :

- sont essentiels à la vie des larves (synthèse des protéines, formation de l'exosquelette) qui se nourrissent aux dépens des galles,
- assurent chez les végétaux la transition entre les produits primaires du métabolisme et les composés phénoliques dont l'accumulation constitue la caractéristique essentielle du métabolisme du Chêne.

MATERIEL ET METHODES

A.- PRESENTATION ET PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL
- I.- CARACTERISTIQUES DU VEGETAL SAIN
- II.- DESCRIPTION ET ORIGINE DES CECIDIES
- III.- RECOLTES ET PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL
- IV.- INCORPORATION DES PRECURSEURS

B.- TECHNIQUES ANALYTIQUES
- I.- EXTRACTIONS
- II.- PURIFICATION ET FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS
- III.- IDENTIFICATIONS ET DOSAGES
- IV.- METHODES SPECIALES AUX ETUDES ENZYMATIQUES

C.- PREPARATION DE L'ACIDE CHORISMIQUE ET DU PREPHENATE DE BARYUM
- I.- PREPARATION DE L'ACIDE CHORISMIQUE
- II.- PREPARATION DU PREPHENATE DE BARYUM

MATERIEL ET METHODES

A.- PRESENTATION ET PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL

I.- CARACTERISTIQUES DU VEGETAL SAIN

a.- Choix de l'espèce Quercus pedunculata

Quercus pedunculata Ehrh., Quercus sessilis Ehrh. et Quercus pubescens Willd. constituent les Chênes les plus fréquents dans la région toulousaine. Par suite de l'hybridation facile entre ces trois essences j'ai retenu, en vue des études analytiques ou enzymatiques, l'espèce Quercus pedunculata car elle présente les caractères distinctifs les plus nets (feuilles glabres, sessiles, pourvues de deux oreillettes, fruits portés par un long pédoncule commun) qui en rendent la détermination aisée et dépourvue d'ambiguïté. De plus, cette essence peut être parasitée par les quatre galles examinées ici (HOUARD, 1908).

Dans cette étude, j'ai utilisé, d'une part, les organes de jeunes plantes obtenues en salle conditionnée, et d'autre part, des feuilles récoltées sur un arbre situé en plein champ.

b.- Cultures

Le choix de l'espèce végétale et la mise au point des techniques culturales ont été effectués, en prévision d'un travail d'équipe axé sur l'étude du métabolisme des composés aromatiques chez le Chêne, en collaboration avec A. BOUDET.

Chaque année, dès leur récolte, au début du mois de novembre, les glands (photo 1) sont placés à une température voisine de 4° C (CAMUS, 1938) ce qui permet de conserver leur faculté germinative jusqu'au mois de mars de l'année suivante.

Photo 1

Glands de Quercus pedunculata, entiers ou sectionnés selon le plan de clivage des cotylédons. Noter la très faible importance de "l'embryon".

En vue des cultures, les glands sont mis à germer, en stratification dans du sable humide, à une température de 20° C. La radicule se développe la première et lorsqu'elle atteint 6 à 7 cm (photo 2), soit après 5 semaines environ, on place les plantules en culture hydroponique sur milieu de HOAGLAND et ARNON contenu dans des bacs en polyéthylène (ALIBERT, 1968).

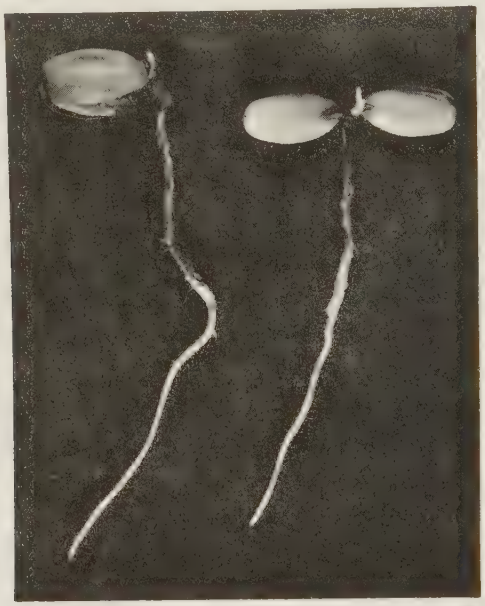


Photo 2

Etat de développement lors de la mise en culture.

Pour un litre, la composition de ce milieu est la suivante : (CHOUARD, 1952 ; CAVALIÉ, 1969) :

$(NO_3)_2$ Ca, 4 H_2O	0,820 g
NO_3K	0,505 g
PO_4HK_2	0,136 g
SO_4Mg, 7 H_2O	0,240 g
SO_4Mn, 7 H_2O	$0,875 \times 10^{-3}$ g
SO_4Zn, 7 H_2O	$0,875 \times 10^{-3}$ g
SO_4Cu, 5 H_2O	$0,175 \times 10^{-3}$ g
BO_3H_3	$0,875 \times 10^{-3}$ g
Citrate de fer ammoniacal	$1,750 \times 10^{-3}$ g
Valeur du pH	5,4

Pour un volume de 7 litres de solution nutritive, chaque bac renferme 9 chênes. Le milieu nutritif est renouvelé tous les 15 jours et son oxygénation est assurée par un barbotage d'air comprimé, réalisé toutes les 48 heures.

Le développement des jeunes plantes s'effectue dans une pièce conditionnée en température, humidité et intensité lumineuse. La lumière artificielle est fournie par des tubes fluorescents Philips type "Lumière du jour". L'éclairement au niveau des feuilles est de 5 000 Lux et la photopériode a été fixée à 14 heures par cycle de 24 heures. Pendant l'hémépériode, l'humidité atteint 65 % de la saturation et pendant la nyctipériode elle est de 75 %. La température, maintenue constante, est fixée à 20° C. Dans ces conditions, on observe la croissance rythmique qui caractérise le développement des parties aériennes des Chênes (LAVARENNE-ALLARY, 1965, 1968).

Le système radiculaire est surtout remarquable par la présence, sur la racine principale, de mycorhizes ectotrophes (photo 3). L'identité du microorganisme impliqué dans cette association n'a pas été déterminée ; il pourrait s'agir d'un champignon basidiomycète (LUPPI et GAUTERO, 1967).

Photo 3

Mycorhizes sur la racine principale des jeunes Chênes de 60 jours.

Dans ce travail, les études ont porté sur des plantes d'âges variables. Les photos 4 (jeunes Chênes de 30 jours) et 5 (jeunes Chênes de 60 jours) représentent deux aspects typiques du développement des parties aériennes.

Photo 4

Jeune Chêne de 30 jours

Photo 5

Jeune Chêne de 60 jours

On remarque la disposition en rosette des feuilles à la partie supérieure de chaque nouvelle pousse.

c.- Récoltes dans la nature

Dans les conditions naturelles, les Chênes manifestent également une croissance rythmique (LAVARENNE-ALLARY, 1965) qui se traduit par l'émission de pousses successives : rameaux de printemps, pousses de la St Jean (vers le 24 juin), pousses d'août,...

A de rares exceptions près, signalées dans la suite du texte, les feuilles utilisées dans ce travail ont été récoltées sur des rameaux de printemps.

II.- DESCRIPTION ET ORIGINE DES CECIDIES

a.- Données générales sur les Cynipides du Chêne et leurs galles

1.- Biologie des Cynipides

En Europe, les galles du Chêne constituent les zoocécidies les plus communes, mais aussi les plus remarquables tant par leur diversité que par la stricte organisation de leur structure interne. Elles sont presque toutes engendrées sous l'action des Cynipides, microhyménoptères dont la taille est généralement comprise entre 0,75 et 5 mm. En plus de leur action cécidogène, l'aspect le plus original de la biologie de ces insectes est leur mode de reproduction qui présente une alternance de générations. Découverte par ADLER en 1877 chez le genre Neuroterus, la

généralité de cette particularité biologique fut ensuite démontrée, chez les autres Cynipides du Chêne, par de nombreux auteurs (cités par KIEFFER, 1897).

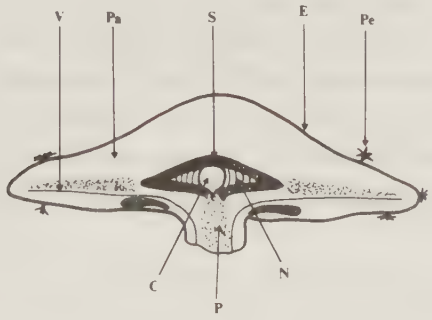
Chaque espèce est donc représentée par deux formes adultes :

- l'une bisexuée souvent estivale,
- l'autre parthénogénétique (ou agame) généralement hivernale.

Ces deux formes présentent souvent une grande dissemblance morphologique et induisent des galles, peu comparables entre elles, situées généralement sur des organes distincts. Par suite de ces grandes différences, chacune de ces formes a reçu une appellation spécifique, parfois même générique, particulière. La description de la galle de Biorhiza pallida fournira un exemple permettant de mieux expliciter ces idées générales (page 12).

2.- Structure interne des galles

Malgré leurs dissemblances morphologiques, les galles de Cynipides présentent des structures très similaires centrées sur le parasite (figure 1).



C : cavité larvaire
P : pédoncule
N : tissu nourricier
P_e : poil étoilé
E : épiderme
S : sclérenchyme
P_a : parenchyme
V : tissu conducteur

Figure 1

Coupe diamétrale d'une galle de Neuroterus lenticularis (SCHNETZLER, 1963)

Ce dernier, situé dans une cavité larvaire au centre de la galle, est entouré d'un tissu nourricier riche en réserves surtout lipidiques et amylacées. Ce tissu est limité par une coque sclérenchymateuse qui assure la protection de la larve (FOURCROY et BRAUN, 1967). Le reste de la galle est constitué d'un parenchyme peu différencié. On observe toutefois de nombreuses variations autour de cette structure typique : absence de certains tissus, coalescences de plusieurs galles entre elles, présence d'excroissances sur l'épiderme,...

b.- Choix des cécidies

J'ai étudié deux galles formées dans les bourgeons et deux galles foliaires induites par quatre Cynipides différents (Biorhiza pallida, Cynips quercustozae, Neuroterus quercusbaccarum et Dryophanta folii) sur les Chênes de la région toulousaine. Ces galles ont été choisies par suite de leur abondance, de la facilité de leur récolte et de leur présence à deux époquesassez éloignées de l'année (printemps et fin de l'été). Elles se développent indifféremment sur les Chênes pédonculés, rouvres ou pubescents (HOUARD, 1908). En raison de la présence de nombreux hybrides entre ces différentes espèces, l'identité des Chênes sur lesquels ont été récoltées ces galles n'est pas toujours aisée à déterminer et ne sera indiquée qu'avec de grandes réserves.

La morphologie, l'anatomie et la cytologie de ces différentes galles ainsi que la biologie de l'agent inducteur ont, le plus souvent, été étudiées en détail (KIEFFER, 1897 ; HOUARD, 1908 ; MANI, 1964). Je me contenterai donc ici d'une description succincte des cécidies et d'un bref rappel du cycle de l'insecte gallicole.

c.- Description des cécidies étudiées

1.- Galle de Biorhiza pallida 01. ♀ ♂

Les différentes étapes du développement de cette galle ont été suivies par ADLER (1881), BEYERINCK (1883), MAGNUS (1914), KÜSTER (1925), REY (1969). Au mois de janvier, la femelle aptère et parthénogénétique de Biorhiza aptera Bosc. forme agame de Biorhiza pallida, scie horizontalement, sous les écailles, l'axe d'un bourgeon de Chêne et dépose un très grand nombre d'oeufs (en général de 100 à 200) entre les deux tronçons. Alors que la partie supérieure du bourgeon dépérit et meurt, la partie inférieure manifeste, à la reprise de la végétation, une activité intense et englobe progressivement les oeufs puis les jeunes larves. A ces phénomènes de croissance succèdent ensuite des processus de différenciation qui aboutissent en particulier à la formation d'un tissu nourricier autour de la larve.

La galle (figure 2 a) atteint son plein développement au mois de mai. C'est une production volumineuse, grossièrement sphérique, pouvant atteindre un diamètre de 5 cm ; sa teinte est jaune-rouge. Elle renferme (figure 2 b) de très nombreuses chambres larvaires (parfois plus de 200). Chaque cavité est entourée d'un tissu nourricier abondant qui se détache en blanc sur le fond brun du reste de la galle.

2 a

2 b

Figure 2

Galles de Biorhiza pallida 01. ♀ ♂

2 a - Galle entière (d'après KIEFFER, 1897)

2 b - Galle coupée montrant les cavités larvaires entourées du tissu nourricier (d'après nature).

De ces galles sortent, au mois de juin, des individus sexués dont les femelles s'enfoncent en terre et déposent leurs oeufs entre les éléments peu lignifiés du bois et le cambium des racines du Chêne (REY, 1967). Des galles racinaires ainsi induites, sortiront, 18 mois plus tard (FOLLIOT, 1964), des femelles parthénogénétiques de Biorhiza aptera. Ce cycle qui constitue le cas le plus simple rencontré chez les Cynipides hétérogoniques est schématisé sur la figure 3.

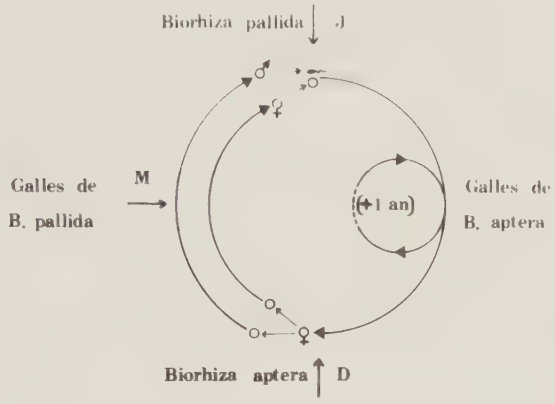


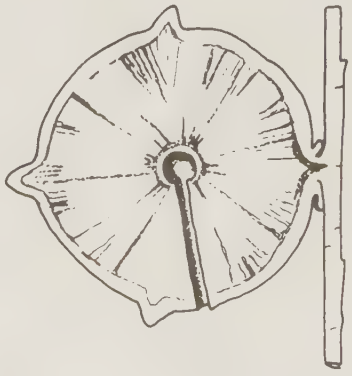
Figure 3

Cycle de développement de Biorhiza (FOLLIOT, 1964)

2.- Galle de Cynips quercustozae Bosc. ♀

Cette galle (figure 4 a) présente grossièrement la forme d'une sphère légèrement étirée aux deux extrémités.

4 a



4 b

Figure 4

Galles de Cynips quercustozae Bosc. ♀ (d'après HOUARD, 1908)

4 a - Galle entière 4 b - En coupe

Elle peut atteindre 4,5 cm de long entre l'apex et la base. Son extrémité supérieure est marquée par une protubérance autour de laquelle est disposée, aux deux tiers supérieurs de la galle, une couronne composée de nodosités plus ou moins proéminentes. La galle, verte au cours de l'été, devient ensuite brune à l'automne. En coupe (figure 4 b) on aperçoit la chambre larvaire, circulaire et de taille réduite par rapport à l'ensemble de la cécidie. Sur la figure est également représentée le tunnel de sortie de l'insecte.

Ces galles sont abondantes tous les deux ans (HOUARD, 1908), mais la biologie du Cynipide qui les induit est mal connue. Les cécidies, analysées dans cette étude, ont été récoltées à la forêt domaniale de Bouconne sur des Chênes hybrides mais à caractère prédominant "sessilis".

3.- Galle de Dryophanta folii Schenk. = Cynips quercusfolii L. ♀♀

Cette galle est provoquée par les larves issues des oeufs que déposent, à la fin du mois de juin (KIEFFER, 1897), les femelles de la génération sexuée (les individus sexués se nomment Dryophanta taschenbergi Schlecdental) à l'intérieur des nervures et à la face inférieure des feuilles de Chêne. La cécidie se développe rapidement ; déjà visible au mois de juillet, elle atteint sa taille maximale au mois de septembre (figure 5 a). Elle possède une forme sphérique (diamètre de 20 à 30 mm), n'est reliée aux nervures que par un fin pédoncule et rien ne trahit sa présence à la face supérieure des feuilles.

5 a

5 b

Figure 5

Galles de Dryophanta folii = Cynips quercusfolii L. ♀♀ (d'après HOUARD, 1908)

5 a - Galles entières à la face inférieure des feuilles

5 b - Coupe d'une galle

6 a

6 b

Figure 6

Galles de Neuroterus quercusbaccarum Ol. ♀♂ (d'après HOUARD, 1908)

6 a - Galles entières à la face inférieure des feuilles

6 b - Coupe d'une galle

Sa surface, souvent garnie de petites aspérités, est jaune pâle ou rouge vif selon son exposition au soleil. En coupe (figure 5 b), cette galle montre une seule cavité larvaire de 3 à 4 mm de diamètre ne renfermant qu'un seul insecte. Cette cécidie est souvent parasitée par des larves d'autres Hyménoptères ou de Diptères et, dans ce cas, la chambre larvaire n'est plus sphérique mais présente des irrégularités.

Lors de la chute des feuilles, ces galles restent attachées à leur support. Elles libèrent aux mois de novembre - décembre, des femelles parthénogénétiques qui pondent leurs oeufs dans des bourgeons dormants de Chêne. Des galles provoquées par les jeunes larves sortiront, au mois de juin suivant, les individus sexués connus sous le nom de Dryophanta taschenbergi.

Les cécidies de Dryophanta folii ont été récoltées aux mois de juillet et septembre à la forêt de Bouconne sur des Chênes hybrides mais sans doute, à forte tendance "sessilis".

4.- Galle de Neuroterus quercusbaccarum Ol. ♀♂

Cette galle (figure 6 a) est induite par les larves issues des oeufs que dépose, à la fin de l'hiver, la femelle parthénogénétique de Neuroterus lenticularis sur les feuilles de Chêne encore incluses dans les bourgeons (KIEFFER, 1897). Au mois de mai, lorsque la cécidie atteint sa taille définitive, elle rappelle un grain de raisin blanc par sa forme, sa couleur et sa consistance. Elle possède un diamètre d'environ 8 mm et sa majeure partie se développe à la face inférieure des feuilles ; elle ne fait saillie à la face supérieure que sous la forme d'un disque arrondi. En coupe (figure 6 b), elle présente une seule cavité larvaire parfois très grande.

Cette galle libère au mois de juin des individus sexués dont les femelles iront pondre à la face inférieure des feuilles de Chêne. Il se forme alors des galles lenticulaires d'où sortiront les femelles agames nommées Neuroterus lenticularis.

d.- Production de cécidies de Neuroterus quercusbaccarum dans des conditions contrôlées

A la fin de l'automne, les feuilles de Chêne parasitées par les galles de Neuroterus lenticularis sont placées, dans les conditions atmosphériques naturelles, dans une cage à insectes garnie de sable humide. Au cours de l'hiver, la galle poursuit sa croissance et libère au mois de février les femelles parthénogénétiques (SCHNETZLER, 1963). Les insectes sont recueillis puis maintenus à proximité des bourgeons de jeunes Chênes par des toiles en nylon dont la rigidité est assurée par une armature métallique. Très rapidement, de nombreux insectes s'installent sur les bourgeons, puis enfoncent leur tarière entre les écailles pour déposer leurs oeufs à la face supérieure des feuilles situées dans les bourgeons (KIEFFER, 1897). A partir du débourrement, les galles foliaires de Neuroterus quercusbaccarum (photos 6 et 7) apparaissent sur tous les Chênes soumis à l'expérimentation. Cette façon d'opérer permet d'obtenir des galles exemptes de parasites et d'âge parfaitement connu. Malgré ces avantages cette méthode, par la surveillance qu'elle implique, se révèle trop laborieuse pour fournir les quantités importantes de matériel végétal nécessité par les analyses. Ainsi, l'expérience décrite a permis d'obtenir 59 galles dont le poids sec était seulement de

810 mg. Les études ultérieures ont donc été effectuées sur des cécidies récoltées dans la nature.

Photo 6

Galles de Neuroterus quercusbaccarum sur les feuilles d'un jeune Chêne.

Photo 7

Disposition des galles à la face inférieure des feuilles.

III.- RECOLTES ET PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL

a.- Récoltes

Les plantules, les feuilles de Chêne ou les galles utilisées dans cette étude ont toujours été récoltées à partir de 9 heures du matin. Les prélèvements de feuilles de Chêne sont aisés et rapides. Dans le cas des cécidies, la dissémination du matériel végétal oblige presque toujours à prolonger la récolte sur des durées assez longues pouvant atteindre 3 heures. Les galles ont été récoltées, soit à la forêt

domaniale de Bouconne, soit à la Faculté des Sciences.

b.- Dissection, stabilisation, conservation

Dès leur arrivée au laboratoire, les cécidies sont débarrassées des larves qu'elles renferment ; quand la dissection est possible, le tissu nourricier est séparé des autres tissus gallaires. Les feuilles qui portent les galles sont conservées sous la dénomination de feuilles parasitées; les feuilles saines correspondant sensiblement aux mêmes étages foliaires constituent les témoins.

En vue de l'analyse des métabolites de faible masse moléculaire : acides aminés, acides organiques, glucides, acides phénoliques,... le matériel végétal est fixé à l'azote liquide puis généralement lyophilisé et conservé à la température de -20° C.

Les échantillons destinés au dosage des acides organiques sont plongés, dès leur fixation, dans l'éthanol à 96° G.L. puis mis en réserve au congélateur (CAVALIÉ, 1969).

Pour éviter les dénaturations éventuelles de certaines enzymes, le matériel végétal récolté pour les études enzymatiques est simplement congelé rapidement à -40° C, lyophilisé puis conservé dans un dessiccateur à la température de -20° C ou encore à la chambre froide.

IV.- INCORPORATIONS DES PRECURSEURS

a.- Incorporations de précurseurs inertes

Les précurseurs inertes sont fournis aux parties aériennes de plantes de Quercus pedunculata cultivées en salle conditionnée, et âgées d'un mois environ. Les incorporations s'effectuent par l'intermédiaire des tiges ; celles-ci sectionnées sous l'eau, sont ensuite introduites, toujours immergées, dans un tube de faible contenance. L'ensemble est ensuite disposé dans une enceinte ventilée, éclairée par 4 lampes de 100 Watts qui maintiennent une intensité lumineuse de 4 000 Lux au niveau des feuilles. On élimine, par aspiration, l'eau contenue dans le tube de verre et on la remplace par la solution du précurseur. Les volumes de solution, en général importants (compris entre 500 et 800 µl), sont néanmoins absorbés par la plante en 4 à 5 heures. Dès la fin de l'absorption du précurseur, on ajoute de l'eau distillée dans le tube, et on laisse la métabolisation se poursuivre pendant le temps désiré, dans les mêmes conditions d'éclairement que l'absorption.

b.- Incorporations de précurseurs radioactifs

1.- Purification

Les composés radioactifs utilisés dans ce travail, (glucose, acide shikimique, phénylalanine, acide glutamique) livrés en solution par le C.E.A., sont purifiés, quelques jours avant leur utilisation, par chromatographie sur papier épais Macherey et Nagel MN 2827 ff dans le solvant butanol, acide acétique, eau (6-1-2). Après des durées variables de migration, le composé radioactif, repéré par autoradiographie, est élué par de l'eau distillée. L'éluat est évaporé à sec et le précurseur repris par un volume connu d'eau distillée. La radioactivité de chaque solution est ensuite déterminée au compteur à circulation gazeuse S.A.I.P.

2.- Incorporations aux galles

Les précurseurs ainsi purifiés ont été fournis à des galles de Biorhiza pallida et Neuroterus quercusbaccarum récoltées sur des Chênes pubescents.

Les galles sont apportées au laboratoire encore fixées sur les rameaux. Dès leur séparation de la plante-hôte, elles sont placées dans des capsules garnies de coton humide, à raison de une galle de Biorhiza et de 8 galles de Neuroterus par capsule. Les capsules garnies sont ensuite placées dans une hotte ventilée, puis à l'aide d'une aiguille lancéolée, on découpe un opercule dans la zone d'insertion de la cécidie sur le végétal, en évitant de léser les chambres larvaires. Dans la cavité ainsi créée, on dépose quelques µl de solution radioactive et, lorsqu'ils sont absorbés par la galle, on provoque l'entraînement à l'intérieur des tissus par des additions répétées d'eau distillée. On replace ensuite l'opercule sur la blessure et on recouvre la galle d'un tampon de coton humide. Dans ces conditions, on n'observe aucun flétrissement de ces organes pourtant riches en eau, même pour des durées de métabolisation élevées.

J'ai aussi fourni les précurseurs radioactifs à des rameaux feuillés exempts de toute attaque parasitaire et provenant du Chêne pubescent sur lequel ont été prélevées le plus grand nombre de galles de Neuroterus. Pour ces rameaux, placés dans la même enceinte que les galles, les incorporations sont réalisées selon la technique décrite dans le cas des plantules. Des pertes sont alors possibles ; pour les connaître, on détermine la radioactivité non absorbée. Par différence avec la quantité fournie, elle permet de connaître la quantité de substance radioactivé réellement absorbée par le végétal.

B.- TECHNIQUES ANALYTIQUES

I.- EXTRACTIONS

a.- Extraction des substances azotées, des acides organiques et des glucides

L'extraction de ces métabolites facilement solubles est réalisée par de l'éthanol à 80° G.L. à l'aide du dispositif d'épuisement en continu mis au point au laboratoire par ALIBERT (1968). L'absence complète de coloration dans l'effluent constitue le critère retenu pour mettre fin à l'extraction. Dans ces conditions, et selon la nature du matériel végétal, le volume d'éthanol utilisé varie entre 200 et 400 ml par gramme de substance sèche. Cet extrait, concentré, clarifié par centrifugation puis amené à un volume connu, est utilisé pour les déterminations portant sur les substances azotées solubles, en particulier les acides aminés. Il constitue l'extrait E_1. La fraction végétale non soluble, recueillie, séchée puis pesée, est utilisée pour l'hydrolyse des protéines.

Dans le cas des extractions effectuées en vue du dosage des acides organiques, le résidu insoluble dans l'alcool est mis en suspension dans l'eau distillée et les sels éventuellement non extraits sont dissociés par addition de résine cationique Dowex 50 (H^+) (ROUX et LESAINT, 1959). Le surnageant obtenu après centrifugation, débarrassé de ses mucilages par de l'éthanol à 80° G.L. est alors additionné à l'extrait E_1 pour constituer l'extrait E_2.

b.- Extraction des composés phénoliques

L'extraction exhaustive des composés phénoliques solubles, présents dans les galles, a été effectuée selon la méthode décrite de façon détaillée par ALIBERT (1968) dans le cas du Chêne. Elle fait appel à des épuisements successifs du matériel végétal par :

- un mélange éthanol - acétate d'éthyle,
- de l'éthanol à 95° G.L.,
- de l'éther éthylique,
- de l'eau distillée.

Les différents extraits, réunis en une solution unique (E_p) puis concentrés sous pression réduite, renferment les diverses combinaisons solubles des acides phénoliques. Le résidu d'extraction fournira, après hydrolyse, les acides phénoliques liés aux polymères insolubles.

II.- PURIFICATION ET FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS

a.- Acides aminés libres

Une fraction aliquote, préalablement acidifiée de l'extrait E_1, est déposée au sommet d'une colonne contenant 10 ml de résine cationique Dowex 50, 100-200 mesh. Après rinçage de la colonne par 100 ml d'eau distillée, on élue les amino-acides par 75 ml d'ammoniaque N et on rince à nouveau par 75 ml d'eau. On évapore à sec, sous pression réduite, en présence de 1 ml d'une solution saturée de carbonate de lithium. On reprend, soit par un faible volume d'eau distillée pour l'identification des acides aminés par chromatographie sur papier, soit par une quantité connue de tampon citrate de pH 2,2 en vue de leur dosage à l'"Amino Acid Analyzer Beckman".

b.- Acides organiques et glucides

Après passage de l'extrait E_2 sur la résine cationique, les acides organiques sont fixés sur 15 ml de résine anionique Dowex 2 X 8, 100-200 mesh, forme carbonate. L'effluent contenant les substances neutres, en particulier les oses et les osides est recueilli, puis concentré. Les acides organiques sont élués par du sesquicarbonate d'ammonium 0,5 M. Cet éluat, évaporé à sec, repris par de l'eau, est utilisé pour l'identification et le dosage des acides organiques.

c.- Fractionnement et hydrolyse des composés phénoliques

Par précipitation à la gélatine, on sépare d'abord les tannins de l'extrait E_p. A partir du matériel végétal initial on isole ainsi :

- les tannins,
- les acides phénoliques et leurs combinaisons solubles,
- un résidu insoluble.

Dans ces différentes fractions, les acides phénoliques n'existent qu'exceptionnellement à l'état libre (RIBEREAU-GAYON, 1968) mais se trouvent plutôt sous forme d'hétérosides ou d'esters. On les libère de leurs combinaisons par des hydrolyses acides pour les liaisons hétérosidiques (BOHM et TOWERS, 1962), alcalines pour les liaisons esters (BOHM et TOWERS, 1962) ; il ne faut pas attribuer à ces deux types d'hydrolyse une spécificité absolue.

Pour pallier la destruction plus ou moins complète de certains acides hydroxycinnamiques lors de l'hydrolyse acide, j'ai également retenu l'action de la β-glucosidase (émulsine) qui rompt spécifiquement les liaisons glucosidiques.

La fraction renfermant les combinaisons solubles des acides phénoliques, divisée en quatre parties égales, est soumise à chacune des trois hydrolyses. La quatrième partie, non hydrolysée, sert à identifier les formes libres. Les tannins ne subissent qu'une hydrolyse acide alors que le résidu d'extraction est soumis à l'action de l'acide et de l'alcali.

Les acides phénoliques libérés, par ces différentes hydrolyses, sont ensuite débarrassés des contaminants non phénoliques essentiellement par une extraction éthérée (ALIBERT, 1968).

III.- IDENTIFICATIONS ET DOSAGES

a.- Détermination de la teneur en eau

La quantité d'eau contenue dans le végétal est obtenue par différence entre le poids du matériel frais et celui du matériel sec déterminé après lyophilisation.

b.- Identification et dosage des composés azotés

1.- Dosage de l'azote total

Les déterminations des teneurs en azote total sont effectuées selon la méthode de Kjeldahl modifiée (BELEY, 1948), la minéralisation étant conduite en présence du catalyseur au sélénium.

2.- Dosage de l'azote soluble et insoluble

Le dosage de l'azote soluble est réalisé sur une fraction aliquote de l'extrait E_1 selon la méthode utilisée pour la détermination de l'azote total. La différence entre les teneurs en azote total et en azote soluble représente l'azote insoluble, reflet des quantités de protéines contenues dans l'organe analysé.

3.- Détermination des teneurs en protéines des extraits enzymatiques

La présence dans les extraits de grandes quantités de composés phénoliques et de polyéthylène glycol ne permet pas une détermination directe des protéines par la méthode de LOWRY et al. (1951). Leurs teneurs sont estimées en multipliant par 6,25 les quantités d'azote déterminées par la méthode de NESSLER selon le protocole de LANG (1958).

4.- Identification des acides aminés et amides

La nature des acides aminés de chaque échantillon est déterminée par chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman 40. La première migration s'effectue dans le mélange solvant : butanol, acide acétique, eau (120-30-50) et la seconde, dans le phénol aqueux (phénol 160, eau 40). Les durées de migration, identiques dans les deux cas, ont été fixées à 7 heures. La révélation des chromatogrammes est réalisée par une solution de ninhydrine à 0,1 % dans le butanol.

5.- Dosage des acides aminés et amides

α.- Acides aminés libres.- Le dosage des acides aminés libres est réalisé à l'"Amino Acid Analyzer Beckman" sur une fraction aliquote de l'éluat provenant de la résine cationique.

β.- Amides.- Le système d'analyse de cet appareil ne permet pas de séparer la glutamine de l'asparagine. Pour les doser, j'ai soumis la solution des acides aminés à une attaque par l'acide chlorhydrique N pendant 3 heures à 110° C. Dans ces conditions, ainsi que j'ai pu le vérifier par chromatographie sur papier, les amides sont complètement hydrolysées. Après l'élimination de l'acide chlorhydrique à l'évaporateur rotatif "Buchi", on reprend l'hydrolysat par un volume de tampon citrate de pH 2,2 identique au volume soumis à l'hydrolyse, et on dose à nouveau les acides aminés. Les quantités d'asparagine ou de glutamine (exprimées en µM) sont obtenues par différence entre les teneurs en acides aspartique et glutamique après et avant hydrolyse.

δ.- Acides aminés des peptides et des protéines.- Malgré l'utilisation courante des acides pour l'hydrolyse des protéines, l'importance relative des facteurs mis en jeu (température, pression, nature des acides,...) demeure encore mal connue. En particulier, dans des essais préliminaires, j'ai pu constater que les quantités d'acides aminés présents dans l'hydrolysat varient selon les temps d'attaque par l'acide chlorhydrique : certains sont plus ou moins rapidement détruits (tryptophane, sérine, thréonine), d'autres ne sont libérés que progressivement (cystine, méthionine). Une détermination rigoureuse des acides aminés protéiques nécessite donc leur dosage après des durées croissantes d'hydrolyse. Dans ce travail, l'examen des protéines inertes occupe une place restreinte ; j'ai donc retenu un seul temps d'hydrolyse : 48 heures.

Dans le cas des peptides, l'hydrolyse est réalisée sur l'extrait E_1 non purifié ; pour les protéines elle s'effectue sur le résidu sec de l'extraction alcoolique.

c.- Identification et dosage des acides organiques

1.- Dosage de l'acide oxalique

L'acide oxalique contenu dans l'extrait E_2, purifié sur Dowex 50, puis sur Dowex 2, est précipité sous forme de sel de calcium. L'oxalate de calcium, recueilli par centrifugation, lavé par une solution saturée d'oxalate de calcium, redissous à la température de 60° C dans l'acide sulfurique, est ensuite dosé par une solution titrée de permanganate de potassium (BAKER, 1952 ; BOUDET, 1968).

2.- Dosage des autres acides organiques

On dépose au sommet d'une colonne de résine Dowex 1 X 10, 200-400 mesh, forme acétate (hauteur de la colonne 20 cm, diamètre 0,9 cm) une fraction aliquote de l'extrait E_2 purifiée comme dans le cas précédent. L'acidité totale de la fraction déposée sur la colonne n'excède jamais 1 méq. L'élution de la colonne est ensuite réalisée par un gradient acide acétique - acide formique, selon le protocole de HULME et WOOLTORTON (1958) légèrement modifié. Dans le flacon mélangeur, contenant initialement 200 ml d'eau distillée, on fait arriver successivement 100 ml d'acide acétique 2,5 N, puis 100 ml d'acide acétique 5 N et finalement 500 ml d'acide formique 6 N. Le débit de la colonne est réglé à 0,5 ml/mn et on recueille des fractions de 4 ml. Le contenu de chaque tube est ensuite transvasé quantitativement dans des capsules et l'élimination des composés volatils est réalisée dans une étuve à circulation d'air dont la température est maintenue à 40° C. Puis, après addition de 2 ml d'eau distillée, on détermine l'acidité de chaque fraction, par de la soude N/200, en présence de rouge de phénol.

3.- Identification des acides organiques

La référence à une élution témoin réalisée dans les mêmes conditions, sur un mélange d'acides organiques connus, constitue le premier moyen retenu pour identifier les acides organiques du végétal.

Pour la caractérisation des substances présentes dans la fraction anionique , j'ai aussi fait appel à la chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman N° 1 dans les solvants suivants :

1ère dimension : éthanol, eau, ammoniaque (80-5-15), durée de migration 8 heures.

2ème dimension : benzoate de méthyle, n-propanol, acide formique, eau (300-700-200-100) (BOVE et RAVEUX, 1957), durée de migration 4 heures.

Les chromatographies monodimensionnelles réalisées dans le deuxième système solvant permettent de vérifier l'identité des substances contenues dans les pics obtenus à la sortie de la colonne de Dowex 1.

La révélation des chromatogrammes est effectuée par pulvérisation du réactif à l'aniline-glucose (CARLES et al., 1958).

d.- Identification des oses et osides

Les glucides solubles de la fraction neutre ont été identifiés par chromatographie sur papier Whatman N° 1 dans le solvant butanol, acide acétique, eau (2-1-1). La durée de la migration est de 24 heures, et la révélation des chromatogrammes est réalisée par le réactif à l'aniline-diphénylamine (SMITH, 1960).

e.- Identification des acides phénoliques

Les acides phénoliques présents dans le végétal à l'état libre, ou apparus après hydrolyse des différentes fractions sont identifiés par chromato-électrophorèse (ALIBERT, 1968). La migration chromatographique s'effectue, pendant 6 heures, sur papier Whatman N° 3 dans le solvant chloroforme, acide acétique, eau (2-1-1) ; l'électrophorèse est réalisée à pH 6,0 grâce à un "Phérographe", sous une tension de 55 volts/cm, dans le sens perpendiculaire à la migration chromatographique.

Les acides phénoliques sont localisés et identifiés par examen du chromatogramme en lumière ultra-violette et par pulvérisation d'une solution de p.nitraniline diazotée (RIBEREAU-GAYON, 1968).

f.- Mise en évidence des composés marqués. Mesure de la radioactivité

1.- Mise en évidence

La localisation et l'identification des composés marqués sur les chromatogrammes ont été effectués par autoradiographie sur films Kodirex de Kodak.

2.- Détermination de la radioactivité des solutions

Les mesures de la radioactivité des solutions ont été effectuées, par scintillation en milieu liquide, au spectromètre "Packard Tricarb 2002". Pour un volume total de 14 ml, chaque flacon contient 13,5 ml d'une solution du mélange scintillant de BRAY (1960) et 0,5 ml de la solution radioactive. Le "quenching" caractéristique de chaque solution est corrigé par la méthode du standard externe.

Cas des acides organiques

La détermination de la radioactivité des acide organiques s'effectue uniquement à partir de la capsule renfermant la plus grande quantité du composé étudié. Le contenu de cette capsule, après dosage acidimétrique, est à nouveau évaporé à sec, puis repris par 2 ml d'eau distillée sur lesquels on prélève 0,5 ml pour le comptage.

3.- Détermination de la radioactivité des acides aminés

L'intensité du marquage des acides aminés a été déterminée par l'utilisation d'une cellule de mesure en continu reliée à la sortie de la colonne de l'"Amino Acid Analyzer". La cellule en lucite possède un volume intérieur de 2 ml ; elle est remplie d'anthracène qui constitue le scintillant. Cette cellule est associée au spectromètre "Packard 2002" dont l'imprimante est remplacée par deux enregistreurs en relation avec les deux canaux de l'appareil. Le double intégrateur commandant les enregistreurs est réglé à deux sensibilités différentes (rapport des sensibilités : 1/10) ce qui accroît les possibilités de détection.

Ce montage est étalonné par des quantités connues d'acide glutamique. Par référence à la courbe d'étalonnage ainsi tracée, la détermination de la surface du pic correspondant à chaque composé marqué permet d'en connaître la radioactivité (exprimée en dpm).

IV.- METHODES SPECIALES AUX ETUDES ENZYMATIQUES

Les méthodes spécifiques aux études enzymatiques seront précisées lors de l'exposé des résultats concernant chaque enzyme. Les substrats et les réactifs utilisés sont le plus souvent d'origine commerciale, sauf en ce qui concerne l'acide chorismique et le préphénate de baryum qui ont été préparés au laboratoire.

C.- PREPARATION DE L'ACIDE CHORISMIQUE ET DU PREPHENATE DE BARYUM

I.- PREPARATION DE L'ACIDE CHORISMIQUE

L'acide chorismique a été isolé du milieu de culture d'*Aerobacter aerogenes* (souche 62-1) selon la méthode décrite par GIBSON (1968). La souche 62-1 nous a été gracieusement fournie par le laboratoire de Génétique Moléculaire de Gif sur Yvette.

a.- Préparation des milieux

1.- Milieu de croissance

La solution concentrée comprend :

Eau distillée	670 ml
SO_4Mg, 7 H_2O	10 g
Acide citrique, H_2O	100 g
PO_4HK_2	500 g
$PO_4HNa\ NH_4$, 4 H_2O	175 g

Pour un litre, le milieu de croissance présente la composition suivante :

20 ml de milieu concentré

40 ml d'extrait de levure "Difco" à 5 %

40 ml d'hydrolysat de caséine 'Difco" à 5 %

20 mg de l-tryptophane

Cette solution est autoclavée 20 minutes à 105° C, puis est additionnée de 10 ml d'une solution stérile de glucose à 16 %.

2.- Milieu d'accumulation

Pour un litre, il renferme :

$PO_4 H Na_2$	12,8 g
$PO_4 H_2K$	1,36 g
Glucose	18 g
$Cl NH_4$	2,7 g
$Cl_2 Mg$	2 ml d'une solution 5×10^{-2} M
l-tryptophane	1 ml d'une solution 10^{-2} M

Ce milieu n'est pas stérilisé.

b.- Protocole expérimental

1.- Culture des bactéries, accumulation

On ensemence un litre de milieu de culture, contenu dans une fiole de Roux, par 10 ml d'une suspension bactérienne conservée à -25° C. Les fioles sont placées au bain-marie à 30° C et les bactéries sont maintenues en suspension à l'aide d'un agitateur magnétique. On assure une aération suffisante du milieu par barbotage d'un courant d'air stérilisé sur coton cardé. On suit la croissance bactérienne par lecture de la densité optique à 620 nm. Lorsque la valeur de la densité optique atteint 1,2 à 1,3 on atteint la fin de la période exponentielle de croissance. On recueille alors les bactéries par centrifugation et on les disperse dans un litre de milieu d'accumulation contenu dans une fiole de Roux. Cette accumulation s'effectue dans les mêmes conditions de température, d'agitation et d'aération que pour la croissance. Après 16 heures, on élimine les bactéries par centrifugation. La valeur du pH du surnageant est ajustée à 8,5 par NH_4OH concentrée. On fixe ensuite l'ensemble des composés anioniques sur une colonne de résine Dowex 1 (Biorad) forme Cl^-, 200-400 mesh, diamètre 2,7 cm, hauteur 10 cm en faisant passer le surnageant à une vitesse de 15 ml/mn à l'aide d'une pompe digitale "Buhler". Cette fixation et l'ensemble des opérations suivantes s'effectuent à la chambre froide.

On rince la colonne par 100 ml d'eau distillée et on élue l'acide chorismique par une solution molaire de chlorure d'ammonium dont la valeur du pH est ajustée à 8,5 par NH_4OH. On recueille des fractions de 10 ml au collecteur. On localise la zone de sortie de l'acide chorismique par détermination de la densité optique à 274 nm d'une fraction aliquote du contenu des tubes dilué 300 fois.

2.- Isolement et purification de l'acide chorismique

Les fractions contenant l'acide chorismique sont réunies (volume en général voisin de 90 ml) et acidifiées à pH 1,5 par HCl N. On transvase dans une ampoule à décanter et on extrait l'acide chorismique par de l'éther éthylique (5 extractions successives par 90 ml d'éther chacune). On déshydrate la phase éthérée par addition de SO_4Mg anhydre. Après une nuit de contact, on concentre la solution sous vide, à une température n'excédant pas 30° C, jusqu'à un volume de 30 ml environ ; on décolore si nécessaire la solution par du charbon BDH "Ultrasorb" puis on élimine ce charbon sur filtre "Durrieux lent".

On précipite l'acide chorismique par addition d'éther de pétrole (P.E. compris entre 50 et 70° C) jusqu'à l'obtention d'un léger louche. On laisse reposer au

réfrigérateur jusqu'à l'apparition des premiers cristaux ; on ajoute à nouveau de l'éther de pétrole et on porte au congélateur à -25° C pendant une nuit ; on élimine l'éther et on recueille les cristaux d'acide chorismique. A ce stade de la préparation GIBSON (1968) indique des rendements de l'ordre de 800 mg à partir de 2 litres de milieu de culture. J'ai obtenu ces valeurs assez régulièrement et pour certaines préparations des quantités supérieures à un gramme.

On redissout l'acide chorismique dans l'eau, on amène la valeur du pH à 9,0 par NH_4OH, on fixe sur une colonne de Dowex 1, 200-400 mesh (diamètre = 2 cm ; hauteur = 10 cm) et on élue par un gradient de $ClNH_4$ M obtenu grâce à l'appareil de HULME et WOOLTORTON (1958). La détection, l'extraction éthérée ainsi que la précipitation de l'acide chorismique, s'effectuent comme dans le cas de la première préparation.

c.- Caractéristiques de l'acide chorismique isolé

J'ai vérifié l'identité du produit isolé en comparant quelques-unes de ses caractéristiques à celles données par GIBSON (1968) et par EDWARDS et JACKMAN (1965).

1.- Chromatographie

La chromatographie est réalisée sur papier Whatman N° 1 dans le solvant benzène, acide acétique, eau (125-72-3). Après migration pendant 4 heures, la position de l'acide chorismique est détectée par examen en lumière U.V. et par pulvérisation de p.nitraniline diazotée (ALIBERT, 1968). Le Rf du produit obtenu est identique à celui indiqué par GIBSON (1964) :

Rf acide chorismique préparé	Rf indiqué par GIBSON
0,53	0,52

2.- Spectres

En solution aqueuse, l'acide chorismique préparé présente un maximum d'absorption dans l'ultra-violet à 274 nm. En solution dans l'éther éthylique, ce maximum est déplacé à 280 nm. Le spectre I.R. de l'acide chorismique méthylé montre la présence de bandes à 3 400, 1 740, 1 625 et 1 200 cm^{-1} caractéristiques respectivement de l'hydroxyle, des liaisons C-O, C-C et de la fonction énol ; toutes ces caractéristiques sont identiques à celles indiquées par GIBSON (1968) et EDWARDS et JACKMAN (1965).

II.- PREPARATION DU PREPHENATE DE BARYUM

a.- Préparation

Le préphénate de baryum a été préparé à partir de l'acide chorismique, par la méthode de GIBSON (1964) légèrement modifiée.

A 100 mg d'acide chorismique en solution dans 1 ml d'eau distillée, on ajoute un excès de carbonate de baryum. Après filtration, la solution de chorismate de baryum dont la valeur du pH est amenée à 8,5 par NH_4OH N est portée pendant 45 minutes à la température de 70° C. On refroidit ensuite rapidement dans un bain eau-glace et on ajoute 2 ml de méthanol et 3 ml de propanol. Le précipité obtenu, recueilli par centrifugation, est ensuite redissous dans 1 ml d'eau distillée. Paraddition de 0,9 ml

de méthanol on obtient un précipité que l'on élimine et enfin, par adjonction au surnageant de 4 ml de méthanol, on recueille le préphénate de baryum.

Le sel de baryum, lavé par l'éthanol, puis par l'éther éthylique, est ensuite séché et pesé.

La meilleure préparation a permis d'obtenir à partir de 100 mg d'acide chorismique, 35 mg de préphénate de baryum correspondant à environ 21 mg d'acide préphénique pur.

b.- Vérification de la pureté du préphénate de baryum

En solution aqueuse, on observe la disparition totale du maximum d'absorption à 274 nm caractéristique de l'acide chorismique.

Son spectre I.R. est superposable à celui donné par GIBSON (1964). Il se distingue de celui de l'acide chorismique par l'apparition d'une bande à 1 730 cm^{-1} caractéristique du groupement cétonique et la disparition de la bande due à la fonction énol.

Par chauffage en milieu acide (HCl 0,5 N) à la température de 37° C, l'acide préphénique se transforme quantitativement en acide phénylpyruvique. L'application de cette méthode de dosage au contrôle de la pureté du préphénate de baryum met en évidence un degré de pureté de 98 %.

PREMIERE PARTIE

CONSTITUTION ET METABOLISME DU CHENE ET DES GALLES

CHAPITRE I

CONSTITUTION AZOTEE DE *Quercus pedunculata*

CHAPITRE II

DONNEES SUR LA CONSTITUTION DES GALLES

CHAPITRE III

ETUDE DE QUELQUES ASPECTS DU METABOLISME DU CHENE ET DES GALLES

CHAPITRE I

CONSTITUTION AZOTEE DE *Quercus pedunculata*

A.- VARIATIONS ANNUELLES DES COMPOSES AZOTES DANS LES FEUILLES

I.- MATERIEL VEGETAL

II.- EVOLUTION DE L'AZOTE TOTAL, INSOLUBLE ET SOLUBLE

III.- ACIDES AMINES LIBRES ET PEPTIDES

a.- Evolution globale

b.- Nature des acides aminés et amides présents à l'état libre

c.- Evolution de quelques composés azotés

IV.- CONCLUSIONS

B.- CONSTITUTION AZOTEE DES JEUNES CHENES

I.- STADES D'ETUDE

II.- EVOLUTION DES MASSES

III.- REMANIEMENTS DES FORMES AZOTEES AU COURS DES PREMIERS STADES DU DEVELOPPEMENT

a.- Plantes entières

b.- Cotylédons

c.- Racines

d.- Feuilles et tiges

IV.- LES ACIDES AMINES LIBRES DES DIFFERENTS ORGANES

a.- Cotylédons

b.- Racines

c.- Feuilles et tiges

V.- LES ACIDES AMINES PROTEIQUES

VI.- CONCLUSIONS

CHAPITRE I

CONSTITUTION AZOTEE DE *Quercus pedunculata*

Les recherches entreprises jusqu'à présent sur le métabolisme azoté du Chêne ont été orientées dans deux directions fort différentes. Elles concernent :

- d'une part, l'étude des variations des quantités d'azote présentes dans les organes du végétal au cours d'une année de végétation (COMBES, 1926 ; SAMPSON et SAMISCH, 1935 ; WOODS et al., 1959),
- d'autre part, la détermination de la nature et de l'abondance des substances de réserve du gland (CAMUS, 1938 ; LUND et SANDSTROM, 1943 ; RÄDER-ROITZSCH, 1958). Ce dernier auteur a, de plus, suivi l'évolution de ces réserves au cours des premiers stades du développement de *Q. pedunculata*.

Ces différentes investigations ont mis en évidence quelques-unes des particularités du métabolisme azoté du Chêne, mais souvent anciennes, elles ne fournissent que peu d'indications sur la nature des composés aminés présents dans ce végétal. Elles ne peuvent donc servir de référence à l'étude du métabolisme azoté des cécidies ; de plus, elles n'apportent aucune indication sur l'importance des acides aminés aromatiques dans le pool azoté total du Chêne.

Il m'a donc semblé nécessaire de compléter les données déjà acquises, d'abord par l'identification, le dosage et l'étude des variations annuelles des composés azotés des feuilles de *Q. pedunculata*, puis par l'examen de la composition azotée des organes de jeunes Chênes cultivés en salle conditionnée.

En toute rigueur, il est évident que les organes provenant d'arbres ou d'arbustes développés dans les conditions naturelles constituent les seuls témoins valables pour les cécidies. Malheureusement, les difficultés d'échantillonnage dues à la masse considérable des organes vivaces rendent leur étude très délicate, sinon impossible, dans les conditions d'équipement du laboratoire. Par contre, les jeunes plantes constituent un matériel d'un emploi commode permettant de dégager aisément les lignes générales du métabolisme d'un végétal ; c'est la raison de leur choix.

A.- VARIATIONS ANNUELLES DES COMPOSES AZOTES DANS LES FEUILLES

I.- MATERIEL VEGETAL

Les déterminations portent sur des feuilles apparues au printemps sur un Chêne situé en plein champ. Les récoltes s'échelonnent du débourrement aux premiers signes du jaunissement automnal.

II.- EVOLUTION DE L'AZOTE TOTAL, INSOLUBLE ET SOLUBLE

Dans ces feuilles, la teneur en azote total est maximale dès la première récolte (tableau I) ; elle diminue jusqu'à la fin mai, se maintient ensuite puis subit une nouvelle baisse à la fin de l'été et en automne.

TABLEAU I

Variations des teneurs en azote total, insoluble et soluble des feuilles de Quercus pedunculata au cours d'une année de végétation. Résultats exprimés en % du matériel sec

Dates des récoltes	N total	N insoluble	N soluble	N sol. x 100 / N total
15/4/66	5,30	5,00	0,30	5,7
22/4	4,30	4,01	0,29	6,7
29/4	3,50	3,29	0,21	6,0
6/5	3,50	3,32	0,18	5,1
13/5	3,30	3,17	0,13	3,9
20/5	2,80	2,67	0,13	4,6
3/6	2,80	2,70	0,10	3,5
1/7	3,00	2,91	0,09	3,0
29/7	3,10	3,01	0,09	2,9
26/8	2,90	2,80	0,10	3,4
7/10	2,80	2,70	0,10	3,5
24/10	2,40	2,30	0,10	4,2

Il est donc probable que les feuilles de Q. pedunculata, comme celles de Q. gambelii et Q. kelloggii (SAMPSON et SAMISCH, 1935), renferment très rapidement après le débourrement leurs quantités maximales de composés azotés. La diminution très nette du taux d'azote total observée au cours du printemps est liée à l'augmentation importante des autres constituants durant la période de croissance active des feuilles. A cette baisse initiale, caractéristique des feuilles jeunes, succède dans les organes adultes une période (mois de juin, juillet, août) pendant laquelle les teneurs restent sensiblement constantes. Enfin, à partir des derniers jours du mois d'août, la sénescence foliaire entraîne à nouveau une baisse très sensible du taux d'azote total. Cette diminution automnale affecte surtout l'azote insoluble, conséquence de la protéolyse précédant la translocation vers les organes vivaces (COMBES, 1926). L'augmentation peu appréciable du taux d'azote soluble confirme d'ailleurs cette hypothèse ; elle permet aussi de déduire que dès leur libération, les composés azotés migrent vers les tiges et les racines.

Enfin, tout au long de la vie des feuilles, l'azote soluble ne constitue qu'une très faible partie de l'azote total (entre 2,9 et 6,7 %) ; les composés azotés présents dans les feuilles sont donc essentiellement de nature protéique (tableau I).

CHAPITRE I

CONSTITUTION AZOTEE DE *Quercus pedunculata*

Les recherches entreprises jusqu'à présent sur le métabolisme azoté du Chêne ont été orientées dans deux directions fort différentes. Elles concernent :

- d'une part, l'étude des variations des quantités d'azote présentes dans les organes du végétal au cours d'une année de végétation (COMBES, 1926 ; SAMPSON et SAMISCH, 1935 ; WOODS et al., 1959),
- d'autre part, la détermination de la nature et de l'abondance des substances de réserve du gland (CAMUS, 1938 ; LUND et SANDSTROM, 1943 ; RÄDER-ROITZSCH, 1958). Ce dernier auteur a, de plus, suivi l'évolution de ces réserves au cours des premiers stades du développement de *Q. pedunculata*.

Ces différentes investigations ont mis en évidence quelques-unes des particularités du métabolisme azoté du Chêne, mais souvent anciennes, elles ne fournissent que peu d'indications sur la nature des composés aminés présents dans ce végétal. Elles ne peuvent donc servir de référence à l'étude du métabolisme azoté des cécidies ; de plus, elles n'apportent aucune indication sur l'importance des acides aminés aromatiques dans le pool azoté total du Chêne.

Il m'a donc semblé nécessaire de compléter les données déjà acquises, d'abord par l'identification, le dosage et l'étude des variations annuelles des composés azotés des feuilles de *Q. pedunculata*, puis par l'examen de la composition azotée des organes de jeunes Chênes cultivés en salle conditionnée.

En toute rigueur, il est évident que les organes provenant d'arbres ou d'arbustes développés dans les conditions naturelles constituent les seuls témoins valables pour les cécidies. Malheureusement, les difficultés d'échantillonnage dues à la masse considérable des organes vivaces rendent leur étude très délicate, sinon impossible, dans les conditions d'équipement du laboratoire. Par contre, les jeunes plantes constituent un matériel d'un emploi commode permettant de dégager aisément les lignes générales du métabolisme d'un végétal ; c'est la raison de leur choix.

A.- VARIATIONS ANNUELLES DES COMPOSES AZOTES DANS LES FEUILLES

I.- MATERIEL VEGETAL

Les déterminations portent sur des feuilles apparues au printemps sur un Chêne situé en plein champ. Les récoltes s'échelonnent du débourrement aux premiers signes du jaunissement automnal.

II.- EVOLUTION DE L'AZOTE TOTAL, INSOLUBLE ET SOLUBLE

Dans ces feuilles, la teneur en azote total est maximale dès la première récolte (tableau I) ; elle diminue jusqu'à la fin mai, se maintient ensuite puis subit une nouvelle baisse à la fin de l'été et en automne.

TABLEAU I

Variations des teneurs en azote total, insoluble et soluble des feuilles de Quercus pedunculata au cours d'une année de végétation. Résultats exprimés en % du matériel sec

Dates des récoltes	N total	N insoluble	N soluble	N sol. x 100 / N total
15/4/66	5,30	5,00	0,30	5,7
22/4	4,30	4,01	0,29	6,7
29/4	3,50	3,29	0,21	6,0
6/5	3,50	3,32	0,18	5,1
13/5	3,30	3,17	0,13	3,9
20/5	2,80	2,67	0,13	4,6
3/6	2,80	2,70	0,10	3,5
1/7	3,00	2,91	0,09	3,0
29/7	3,10	3,01	0,09	2,9
26/8	2,90	2,80	0,10	3,4
7/10	2,80	2,70	0,10	3,5
24/10	2,40	2,30	0,10	4,2

Il est donc probable que les feuilles de Q. pedunculata, comme celles de Q. gambelii et Q. kelloggii (SAMPSON et SAMISCH, 1935), renferment très rapidement après le débourrement leurs quantités maximales de composés azotés. La diminution très nette du taux d'azote total observée au cours du printemps est liée à l'augmentation importante des autres constituants durant la période de croissance active des feuilles. A cette baisse initiale, caractéristique des feuilles jeunes, succède dans les organes adultes une période (mois de juin, juillet, août) pendant laquelle les teneurs restent sensiblement constantes. Enfin, à partir des derniers jours du mois d'août, la sénescence foliaire entraîne à nouveau une baisse très sensible du taux d'azote total. Cette diminution automnale affecte surtout l'azote insoluble, conséquence de la protéolyse précédant la translocation vers les organes vivaces (COMBES, 1926). L'augmentation peu appréciable du taux d'azote soluble confirme d'ailleurs cette hypothèse ; elle permet aussi de déduire que dès leur libération, les composés azotés migrent vers les tiges et les racines.

Enfin, tout au long de la vie des feuilles, l'azote soluble ne constitue qu'une très faible partie de l'azote total (entre 2,9 et 6,7 %) ; les composés azotés présents dans les feuilles sont donc essentiellement de nature protéique (tableau I).

III.- ACIDES AMINES LIBRES ET PEPTIDES

a.- Evolution globale

L'évolution des acides aminés libres pris dans leur totalité est comparable à celle de l'azote soluble (figure 7) ; on note toutefois au début de la végétation une légère élévation de leurs teneurs alors que l'azote soluble commence déjà à décroître. Les formes libres sont toujours plus abondantes que celles engagées dans les peptides ; les différences les plus grandes sont observées lors des premières récoltes. Par la suite, les valeurs se rapprochent et les deux fractions présentent des fluctuations peu accusées.

Figure 7

Evolution des teneurs en N soluble Δ-·-·-Δ en acides aminés ●-----● et en peptides ○——○ des feuilles de Quercus pedunculata au cours d'une année de végétation

Les quantités d'azote contenues dans les acides aminés libres et les amides sont toujours nettement inférieures aux teneurs en azote soluble ; les acides aminés peptidiques n'influencent guère ce résultat et les valeurs du rapport : $\frac{\text{N des ac. aminés totaux}}{\text{N soluble}}$ varient entre 21 et 54 % selon le stade considéré.

b.- Nature des acides aminés et amides présents à l'état libre

Les amides constituent toujours une fraction élevée, 25 % environ, des substances azotées solubles (tableau II).

TABLEAU II

Acides aminés libres et peptidiques des feuilles de Quercus pedunculata

Dates des récoltes :	22/4/66			26/8/66		
	Ac. aminés libres		Ac. aminés peptidiques	Ac. aminés libres		Ac. aminés peptidiques
Ac. aminés et amides	µM/g mat. sec	% du total	µM/g mat. sec	µM/g mat. sec	% du total	µM/g mat. sec
Asp NH_2	10,48	16,67	0,00	1,58	10,65	0,00
Glu NH_2	4,33	6,89	0,00	2,33	15,70	0,00
Ser	5,92	9,42	1,41	1,67	11,25	0,00
Glu	0,69	1,10	0,00	2,92	19,68	0,00
Asp	0,78	1,24	0,00	0,83	5,59	0,00
Ala	22,91	36,45	5,13	2,28	15,36	0,87
Arg	1,27	2,02	0,60	0,12	0,81	0,13
Pro	4,06	6,46	1,54	0,45	3,03	0,14
Lys	0,60	0,95	0,80	0,19	1,28	0,25
His	0,45	0,71	0,45	0,04	0,27	0,15
Gly	0,86	1,37	6,28	0,23	1,54	2,05
Thr	1,25	1,99	0,72	0,31	2,09	0,37
Val	1,65	2,62	0,72	0,27	1,81	0,20
Ile	0,65	1,03	0,36	1,15	7,75	0,32
Leu	0,99	1,57	0,54	0,09	0,61	0,55
Tyr	4,91	7,81	0,00	0,26	1,75	0,07
Phe	1,06	1,68	0,37	0,12	0,81	0,18
Total	62,86	100,0	18,92	14,84	100,0	5,28
en % de l'N sol.	39,4		10,6	27,1		8,70

La nature des autres composés aminés prépondérants à l'état libre dépend du stade de développement de la feuille : la présence de quantités réduites d'acide glutamique et aspartique, importantes de proline et de tyrosine, considérables d'alanine, peuvent être considérées comme les caractéristiques les plus nettes des feuilles jeunes.

Parmi les acides aminés aromatiques, seule la tyrosine se signale par son abondance à l'état libre, mais uniquement dans les feuilles jeunes. A la fin de la croissance foliaire elle ne persiste plus qu'à l'état de traces mais continue néanmoins à être mieux représentée que la phénylalanine ; quant au tryptophane, il n'a jamais été détecté à l'état libre.

c.- Evolution de quelques composés azotés

Une analyse plus détaillée des variations de quelques-uns des composés aminés les plus marquants de la fraction azotée soluble permet de distinguer trois types d'évolution (figure 8) :

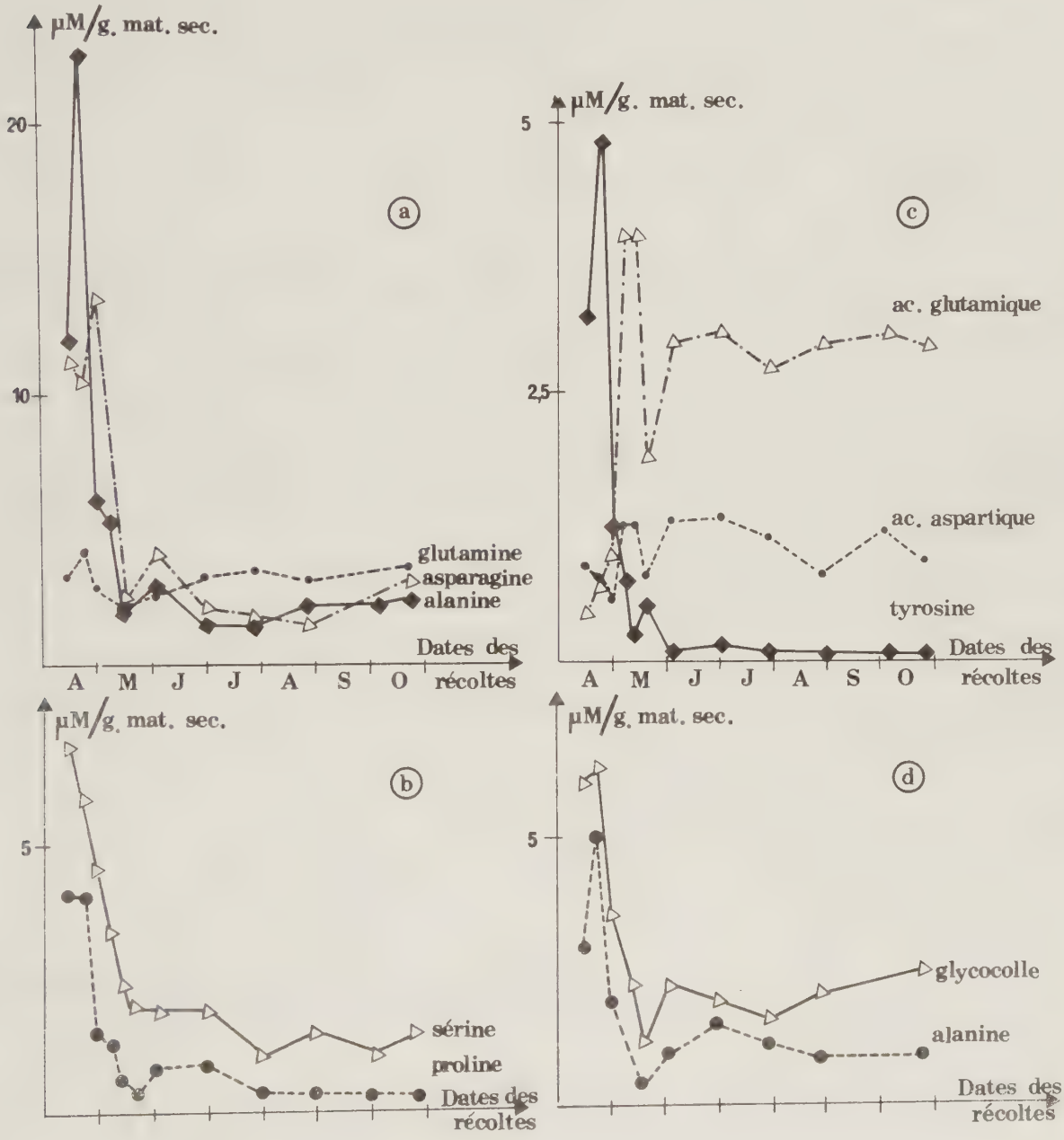


Figure 8

Variations annuelles de quelques composés azotés des feuilles de Q. pedunculata
8 a, 8 b, 8 c : acides aminés et amides libres - 8 d : acides aminés peptidiques

- certains comme la proline ou la sérine, abondants dès la première récolte, diminuent très brusquement dans les jours suivants (figure 8 b),

- pour d'autres tels l'alanine, l'asparagine (figure 8 a), la tyrosine (figure 8 c), ou pour les acides aminés prépondérants des peptides (figure 8 d), on observe un enrichissement rapide des feuilles au cours du mois d'avril suivi d'une baisse spectaculaire, les teneurs devenant très nettement inférieures à leurs valeurs initiales.

Enfin, les acides aminés dicarboxyliques, dont l'importance est limitée dans les feuilles jeunes, présentent au cours de la végétation des fluctuations assez comparables ; l'acide glutamique se distinguant par sa teneur élevée dans les feuilles âgées (figure 8 c).

IV.- CONCLUSIONS

Les substances azotées présentes dans les feuilles de Q. pedunculata sont surtout de nature protéique ; l'azote contenu dans les constituants solubles ne représente qu'une faible fraction de l'azote total.

Au cours d'une année de végétation, les teneurs maximales en composés azotés solubles ou insolubles se rencontrent dans les feuilles très jeunes ; elles diminuent durant la période de croissance, se stabilisent dans les feuilles bien développées puis subissent, à la fin de l'été et au cours de l'automne, une nouvelle baisse qui affecte surtout l'azote insoluble, conséquence de la protéolyse précédant la migration vers les organes vivaces.

Malgré leur faible abondance, les acides aminés libres ainsi que les constituants primordiaux des peptides (glycocolle, alanine) présentent également des fluctuations annuelles très accusées. Les feuilles jeunes renferment des teneurs nettement plus élevées que les organes âgés ; elles s'en distinguent aussi par leur taux très faible en acides aspartique et glutamique et par leur grande richesse en alanine, en tyrosine et en proline.

B.- CONSTITUTION AZOTEE DES JEUNES CHENES

I.- STADES D'ETUDE

Pour identifier les constituants azotés des organes de Q. pedunculata et suivre leur évolution au cours des premières étapes du développement, j'ai retenu les stades d'étude suivants :

Stades	Etat de développement	Organes analysés
I	Glands stratifiés pendant 21 jours, racines non développées	Cotylédons
II	Glands stratifiés pendant 35 jours	Cotylédons Racines
III	Plantes âgées de 15 jours	Cotylédons Racines Tiges Feuilles
IV	Plantes âgées de 30 jours, départ de la seconde pousse amorcé	Cotylédons Racines Tiges Feuilles

La constitution du gland au repos a également été examinée ; mais ces analyses ont porté sur des fruits provenant d'une autre récolte, aussi les résultats acquis ne peuvent-ils être retenus pour suivre l'évolution des métabolites.

II.- EVOLUTION DES MASSES

La quantité de matière sèche (figure 9) constitutive de la graine puis de la jeune plante diminue très nettement jusqu'au plein développement des feuilles (stade III). Au contraire, la quantité de matière fraîche augmente très rapidement dès la sortie de la radicule ; malgré la présence du milieu nutritif, le développement résulte donc essentiellement d'une absorption d'eau dans le milieu extérieur.

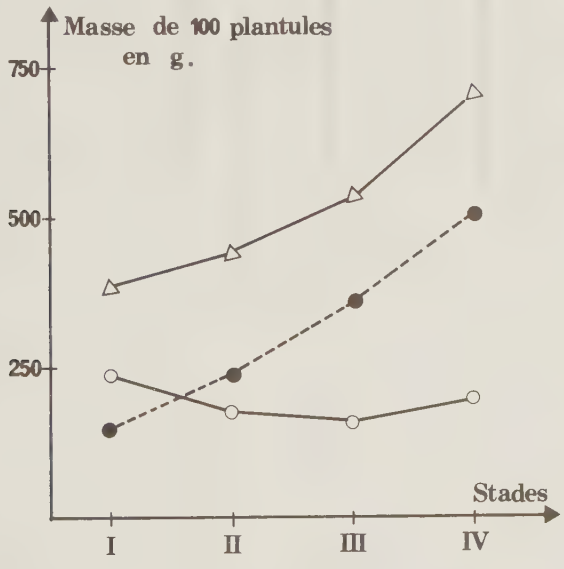


Figure 9

Evolution des masses de matériel frais △——△ et de matériel sec ○——○ et des quantités d'eau ●----● au cours du développement

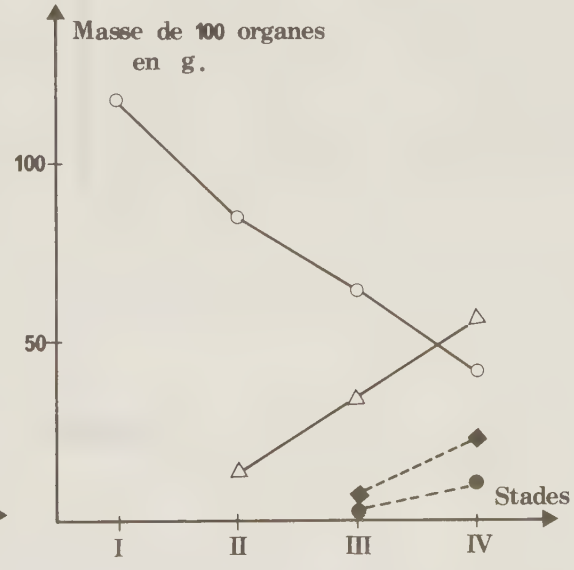


Figure 10

Evolution des masses de matériel sec ○——○ cotylédons ■----■ tiges △——△ racines ●----● feuilles

Les réserves cotylédonaires contribuent à l'élaboration des autres organes et surtout des racines (figure 10) ; la diminution de la matière sèche totale des jeunes plants indique qu'elles sont aussi utilisées, par des processus respiratoires accrus (GIRTON et PARK, 1941), pour subvenir aux besoins énergétiques du végétal.

III.- REMANIEMENTS DES FORMES AZOTEES AU COURS DES PREMIERS STADES DU DEVELOPPEMENT

a.- Plantes entières

Les teneurs en azote total des graines diminuent légèrement au cours de la stratification (figure 11), sans doute par suite d'une excrétion de substances azotées dans le milieu.

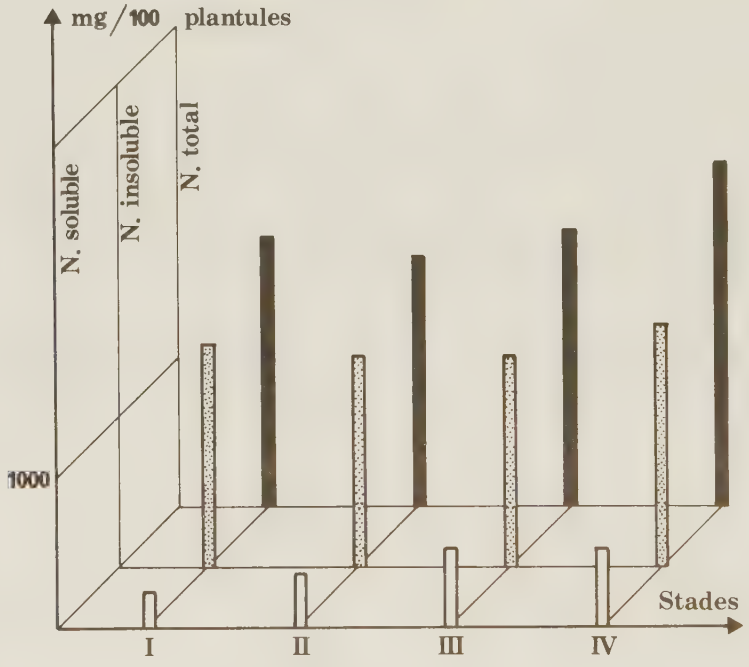


Figure 11

Evolution de l'azote total insoluble et soluble au cours du développement

Dès la mise en culture, les quantités totales atteignent (stade III) puis dépassent (stade IV) leur niveau initial mettant en évidence une absorption de nitrates à partir de la solution nutritive. Pourtant, même pour les plantes les plus âgées, l'intensité de cette absorption demeure limitée. Ainsi, au stade IV, les substances azotées fournies par les cotylédons représentent encore 70 % environ de l'azote total.

L'azote protéique évolue parallèlement à l'azote total dont il représente la fraction principale ; l'importance des constituants azotés solubles demeure toujours faible.

b.- Cotylédons

Chez le gland, les réserves sont essentiellement de nature glucidique (amidon, sucres solubles) (CAMUS, 1938). Les analyses effectuées sur des semences non stratifiées indiquent dans les cotylédons un taux d'azote total de 0,88 % ; ces organes ne renferment donc que 5 % environ de protéines. Néanmoins, malgré ces faibles teneurs et par suite de la masse importante des cotylédons, les quantités de protéines contenues dans les glands sont élevées (environ 150 mg par fruit).

Au cours du développement, ces composés azotés suivent l'évolution générale des autres réserves de la graine et on observe une diminution très rapide des quantités d'azote total, insoluble et soluble contenues dans les cotylédons (tableau III).

TABLEAU III

Evolution des quantités d'azote total, insoluble et soluble présentes dans les cotylédons. Résultats exprimés en mg d'N/100 organes

Stades	N total	N insoluble	N soluble	$\frac{\text{N sol. X 100}}{\text{N total}}$
I	889	759	130	14,6
II	699	590	109	15,6
III	423	323	100	23,6
IV	233	161	72	31,0

Par ailleurs, comme les taux d'azote total et protéique diminuent (figure 12), on peut en déduire que l'épuisement des réserves azotées s'effectue à une vitesse légèrement plus rapide que celle des autres constituants de la semence.

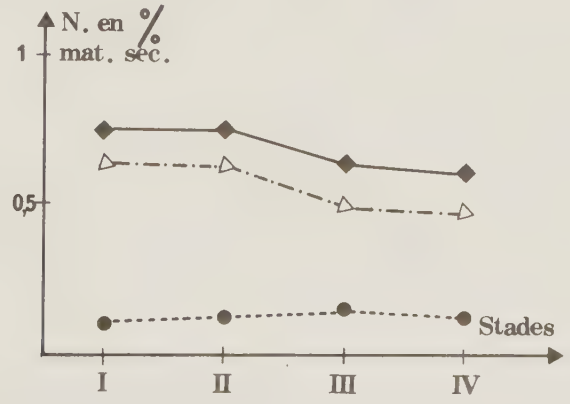


Figure 12

Variations des teneurs en N total ◆——◆ N insoluble et Δ-·-·-Δ N soluble ●-------● des cotylédons

Malgré l'ampleur de la diminution de l'azote insoluble, on ne constate pourtant aucune accumulation de composés azotés solubles dans les cotylédons (tableau III et figure 12). Dès leur libération les constituants des protéines (ou des acides nucléiques) migrent donc vers les organes en croissance.

c.- Racines

Premiers organes apparus lors de la germination de la graine, les racines constituent initialement le lieu de migration unique des composés azotés provenant des cotylédons. Au cours des premiers stades du développement, les quantités d'azote total, insoluble et soluble qu'elles renferment, s'élèvent constamment (tableau IV).

TABLEAU IV

Evolution des quantités d'azote total, insoluble et soluble présentes dans les racines. Résultats exprimés en mg d'N/ 100 organes

Stades	N total	N insoluble	N soluble	$\frac{\text{N sol. x 100}}{\text{N total}}$
II	251	110	141	56,2
III	657	348	309	47,0
IV	761	432	329	43,2

Cette augmentation résulte essentiellement d'un accroissement de leur masse, car les teneurs varient différemment selon la fraction azotée considérée (figure 13).

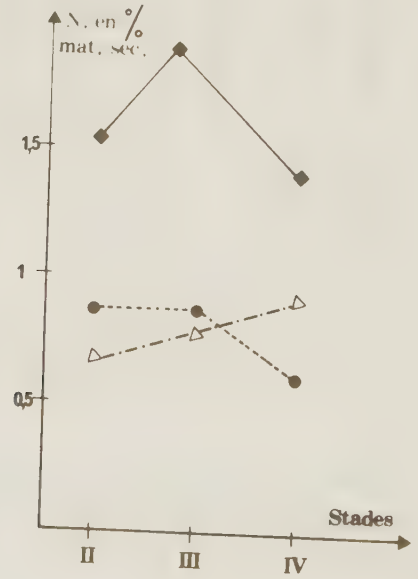


Figure 13

Variations des teneurs en N total ■——■ N insoluble Δ-·-·-·-Δ et N soluble ●·····● des racines

Par rapport aux autres organes (cotylédons, tiges ou feuilles), la caractéristique la plus remarquable des racines est leur très grande richesse en composés azotés solubles (tableau IV et figure 13). A la fin de la stratification (stade II), et donc en absence de tout apport extérieur de nitrates, l'azote soluble représente plus de la moitié de l'azote total. Ce résultat démontre que les composés azotés de faible poids moléculaire libérés dans les cotylédons migrent vers les racines. Dans ces organes, une protéogénèse initiale peu intense (faible teneur en N insoluble) assure le maintien d'un taux élevé d'N soluble.

A partir du plein développement des parties aériennes, et bien que les racines baignent dans le milieu nutritif (stade III à stade IV), l'arrivée moins massive des métabolites (diminution de la teneur en azote total) et une synthèse protéique accrue (élévation du taux d'azote protéique) entraînent une baisse sensible de la teneur en azote soluble (figure 13).

d.- Feuilles et tiges

Comme en témoignent leur taux élevé en azote insoluble et la faible valeur du rapport $\frac{\text{N soluble}}{\text{N total}}$ (tableau V), les feuilles sont le siège d'une synthèse protéique active. Par unité de masse sèche, elles renferment pourtant nettement moins de protéines que les feuilles prélevées au même âge dans les conditions naturelles (récolte du 22/4/66 et stade III des tableaux I et V). De multiples raisons peuvent expliquer ces divergences. On peut, en effet, mettre en cause : une nutrition azotée différente des feuilles selon leur origine, une influence néfaste des conditions artificielles de culture sur la protéogénèse ou encore une arrivée importante de glucides dans les feuilles des jeunes Chênes.

TABLEAU V

Composition en azote total, insoluble et soluble des feuilles et des tiges

Organes	Stades	N total mg/100 organes	N total % mat. sec	N insoluble mg/100 organes	N insoluble % mat. sec	N soluble mg/100 organes	N soluble % mat. sec	$\frac{\text{N sol.} \times 100}{\text{N total}}$
Feuilles	III	47	2,42	41	2,10	6	0,32	13,2
	IV	235	2,55	173	2,21	31	0,34	13,3
Tiges	III	103	1,09	75	0,79	28	0,30	27,5
	IV	324	1,35	242	1,01	82	0,34	25,2

Les tiges présentent des teneurs en azote total nettement plus faibles que les feuilles, tout en conservant un taux sensiblement identique de composés azotés solubles ; il en résulte une élévation du rapport $\frac{\text{N soluble}}{\text{N total}}$, accroissement qui accompagne, comme chez les racines, une synthèse protéique réduite (faible teneur en azote insoluble).

Au cours de leur croissance, ces parties aériennes continuent de recevoir en quantités importantes des substances azotées provenant des cotylédons et des racines (tableau V). Chez ces jeunes Chênes, la croissance des feuilles ne modifie pas de façon sensible leur teneur en azote total alors que ces mêmes organes, prélevés sur un arbre, présentent après le débourrement une chute rapide de leur taux initial en composés azotés (tableau I).

IV.- LES ACIDES AMINES LIBRES DES DIFFERENTS ORGANES

a.- Cotylédons

Dans les cotylédons, les taux d'acides aminés ou d'amides présents à l'état libre demeurent toujours très faibles (tableau VI).

TABLEAU VI

Acides aminés libres des cotylédons

	µM/g matériel sec			µM/100 organes		
Stades	I	II	III	I	II	III
Acides aminés et amides						
Asp NH_2	4,67	6,70	7,30	553	608	483
Glu NH_2	0,60	0,60	4,16	71	54	275
Ser	2,09	2,43	3,31	248	221	219
Glu	9,82	10,49	9,42	1164	952	623
Asp	9,96	3,20	2,27	1180	290	150
Ala	1,20	5,19	0,70	142	471	46
Arg	1,53	1,53	1,40	181	138	93
Pro	2,59	4,44	1,27	307	403	84
Lys	0,29	0,47	0,65	34	43	43
His	0,45	0,71	1,10	53	64	72
Gly	0,38	0,17	0,45	45	15	30
Thr	0,90	1,53	1,31	106	139	87
Val	0,39	1,25	1,58	46	113	104
Ile	0,24	0,81	0,89	28	73	59
Leu	0,15	0,50	0,82	18	45	54
Tyr	0,10	0,22	0,79	12	20	52
Phe	0,22	1,25	1,47	26	113	97
Total	35,58	41,49	38,89	4214	3762	2571
en % de l'N soluble	58,1	65,0	53,3			

L'asparagine et, parmi les aminoacides, les acides glutamique et aspartique constituent les composés azotés les plus abondants, tandis que les acides aminés dicarboxyliques et leurs amides sont les composés prépondérants des protéines cotylédonaires

(tableau X). Tous ces métabolites ne représentent pourtant qu'une faible proportion de l'azote total. Les glands ne possèdent donc aucune forme particulière de stockage des réserves azotées.

Au cours du développement, la teneur en asparagine s'élève tandis que diminue le taux d'acide aspartique ; il se produit, sans doute sous l'influence de l'asparagine synthétase (HELLER, 1969), une amidation de cet acide aminé. Exception faite de la glutamine, les autres composés azotés, présents à l'état libre et en quantités notables dans les cotylédons, ne manifestent que des fluctuations peu accusées (sérine, acide glutamique, arginine) ou irrégulières (alanine, proline). Le fait le plus marquant dans ces dosages réside dans l'augmentation proportionnellement importante des acides aminés libres initialement peu abondants (tableau VI), mais bien représentés dans les protéines (tableau X) : thréonine, leucine, isoleucine, tyrosine, phénylalanine. Cette apparition d'acides aminés essentiellement protéiques montre que l'utilisation des réserves azotées des cotylédons procède par une hydrolyse préalable. Malgré l'intensité de cette protéolyse, on n'observe qu'un léger accroissement de la teneur globale en acides aminés libres (tableau VI, µM/g matériel sec), accompagnée d'une diminution régulière de leurs quantités totales (tableau VI, µM/100 organes). La preuve de leur mobilisation rapide vers les organes en croissance est ainsi établie.

b.- Racines

Aux deux stades étudiés, la teneur en acides aminés libres des racines (tableau VII) est très nettement supérieure à celle de tous les autres organes. La présence de ces composés azotés explique pour une grande part (70 à 80 %) le taux très élevé d'azote soluble des racines (tableau IV, et figure 13).

A un même stade de développement (stade II), on constate, par rapport aux cotylédons, un accroissement de la concentration de la quasi-totalité des acides aminés ; les plus abondants dans les cotylédons demeurent cependant, en règle générale, les mieux représentés dans les racines. Les différences les plus nettes entre les deux organes se traduisent, d'une part, par la richesse des racines en thréonine, valine, arginine et surtout asparagine et, d'autre part, par la pauvreté en proline du système radiculaire.

Les acides aminés provenant de l'hydrolyse des protéines cotylédonaires migrent donc vers les racines, organes dans lesquels ils subsistent, au moins en partie, à l'état libre. Cette accumulation se poursuit même après le développement des parties aériennes de la plante (tableau VIII, augmentation des quantités entre les stades II et III). Elle ne résulte pas d'un simple transfert comme le montre la dissemblance de composition aminée des deux organes, et, plus particulièrement, l'abondance d'asparagine et d'arginine dans les racines.

De telles accumulations ont déjà été observées chez d'autres espèces végétales, mais les explications fournies diffèrent selon le composé azoté considéré :

- pour GUITTON (1964) l'arginine, très abondante à l'état libre dans les plantules de Pinus pinea, provient de l'hydrolyse des réserves de l'endosperme.
- selon MEISS (1952) l'accumulation d'asparagine dans les hypocotyles de Lupin résulte d'une biosynthèse de l'amide in situ.

TABLEAU VII

Teneurs en acides aminés libres des racines, des tiges et des feuilles (µM/g de matériel sec)

	Racines		Tiges	Feuilles
Stades	II	III	III	III
Ac. aminés et amides				
Asp NH_2	157,45	147,30	30,62	2,75
Glu NH_2	3,75	4,15	3,85	1,47
Ser	12,60	8,70	4,10	2,93
Glu	11,35	8,85	7,42	5,63
Asp	4,75	10,15	6,13	3,88
Ala	17,15	2,15	2,37	1,28
Arg	13,95	37,95	4,45	1,08
Pro	+	+	1,72	0,43
Lys	0,75	1,15	0,53	0,15
His	1,15	2,45	0,57	0,17
Gly	1,15	0,65	0,28	0,13
Thr	5,80	4,55	2,33	0,42
Val	2,45	2,95	1,07	0,33
Ile	1,25	0,60	0,35	0,08
Leu	0,75	0,50	0,22	0,08
Tyr	0,60	0,27	0,32	0,10
Phe	0,60	0,24	0,55	0,20
Total	235,50	232,61	66,88	21,11
% de l'N soluble	71,0	79,3	54,0	12,8

TABLEAU VIII

Quantités d'acides aminés dans les racines, les tiges et les feuilles (µM/100 organes)

	Racines		Tiges	Feuilles
Stades	II	III	III	III
Ac. aminés et amides				
Asp NH_2	2549	5108	289	5,4
Glu NH_2	61	144	36	2,9
Ser	204	302	39	5,7
Glu	184	307	70	11,0
Asp	77	352	58	7,6
Ala	278	74	22	2,5
Arg	226	1315	42	2,1
Pro	+	+	16	0,8
Lys	12	40	5	0,3
His	19	85	5	0,3
Gly	19	22	3	0,3
Thr	94	158	22	0,8
Val	40	102	10	0,6
Ile	20	21	3	0,2
Leu	12	17	2	0,2
Tyr	10	9	3	0,2
Phe	10	8	5	0,4
Total	3815	8064	630	41,3

Pour déterminer, dans le cas du Chêne, la nature des processus mis en jeu, migration ou formation de novo, j'ai évalué les quantités d'asparagine et d'arginine mises à la disposition des racines par l'épuisement des réserves cotylédonaires (tableau IX).

TABLEAU IX

Migration de l'asparagine et de l'arginine cotylédonaires vers les racines entre les stades I et II

Organes	Cotylédons			Racines	
	µM/200 organes		µM totales disparues	µM/100 organes	µM totales apparues
Stades	I	II		II	
Composés azotés					
libre	1106	1216		2549	
Asp NH_2			290		2633
protéique*	1290	1000		84	
libre	362	276		226	
Arg			218		256
protéique	592	460		30	

* Quantités déterminées en admettant que la totalité de l'acide aspartique libéré par l'hydrolyse des protéines provient de l'asp NH_2 (cas le plus défavorable dans l'hypothèse considérée).

Les valeurs de ce tableau montrent l'origine essentiellement cotylédonaire de l'arginine. Par contre, les faibles quantités d'asparagine, libérées par les cotylédons, plaident fortement en faveur d'une biosynthèse active de cette amide dans les racines à partir des substances aminées de migration.

c.- Feuilles et tiges

Les feuilles (tableaux VII et VIII) sont pauvres en acides aminés et amides libres ; de plus, l'ensemble de ces substances ne constitue qu'une faible fraction des composés azotés solubles totaux (12,8 %). Dans ces organes, les amides, la sérine, l'alanine, les acides glutamique et aspartique sont les métabolites les plus importants à l'état libre.

Par leurs faibles teneurs en proline, en alanine et en acides aminés libres totaux, et par leur abondance relative en acides aminés dicarboxyliques, les feuilles de ces jeunes Chênes possèdent une composition proche de celle des feuilles âgées développées dans les conditions naturelles (tableau II, page 34).

Elles se rapprochent aussi de ces dernières par leurs faibles teneurs en phénylalanine et surtout en tyrosine. On constate, pourtant que la phénylalanine est mieux représentée à l'état libre dans les feuilles des jeunes plantes, alors que la tyrosine est toujours le composé prépondérant dans celles développées dans les conditions naturelles.

Les tiges possèdent des taux d'acides aminés libres toujours plus élevés que les feuilles (tableau VII) ; elles s'en distinguent aussi par leurs plus fortes teneurs en asparagine essentiellement, et aussi en arginine, en proline, en thréonine et en valine (tableaux VII et VIII). Cet aspect de leur composition les rapproche des racines et suggère que ces organes sont également un lieu d'accumulation temporaire des substances azotées provenant des cotylédons.

V.- LES ACIDES AMINES PROTEIQUES

Les protéines constitutives de tous les organes de la plante (tableau X) renferment de faibles quantités de cystine, de méthionine, de tyrosine et d'histidine.

TABLEAU X

Acides aminés des protéines en % des acides aminés totaux libérés par hydrolyse acide

Organes	Cotylédons	Racines	Tiges	Feuilles
Ac. aminés et amides				
Lys	5,20	6,66	13,46	5,42
His	2,64	2,34	5,29	1,69
Arg	6,80	4,58	8,44	8,58
Asp + Asp NH_2	11,22	10,27	7,66	9,14
Thr	4,00	5,62	3,92	5,38
Ser	4,52	6,62	4,57	5,21
Glu + Glu NH_2	16,10	11,26	8,18	10,76
Pro	5,90	8,23	6,67	7,02
Gly	8,90	8,39	7,84	9,18
Ala	8,20	8,83	5,69	9,42
Val	7,36	7,91	9,08	7,18
Ile	5,10	5,27	4,31	5,43
Leu	8,88	8,62	10,06	9,81
Tyr	1,38	1,52	1,37	1,58
Phe	3,80	3,87	3,46	4,20

Les acides aminés soufrés n'apparaissent pas dans ces analyses car la durée d'hydrolyse retenue ne permet pas leur libération. J'ai en effet pu me rendre compte qu'ils ne deviennent détectables que pour des temps d'attaque par l'acide chlorhydrique supérieurs à 60 heures.

Dans tous les organes, les protéines se révèlent riches en leucine, glycocolle et alanine. Celles des tiges se signalent par leurs teneurs anormalement élevées en acides aminés basiques : arginine, histidine et lysine.

VI.- CONCLUSIONS

Dans les limites de développement fixées, l'augmentation de la masse des jeunes plants de Quercus pedunculata résulte essentiellement d'une absorption d'eau, l'assimilation chlorophyllienne ne parvenant que tardivement à compenser la déperdition initiale de matière sèche.

Malgré un apport extérieur de nitrates, les réserves de la graine constituent la principale source d'azote pour les organes en croissance. Le métabolisme azoté des jeunes Chênes est donc dominé par la mobilisation des réserves cotylédonaires et la transformation des composés qui en dérivent.

Dans les glands, les substances azotées ne représentent qu'une faible partie des réserves totales ; elles sont constituées d'acides aminés libres, mais surtout de protéines, sans que l'on puisse mettre en évidence, dans l'une de ces fractions, une substance particulière de stockage de l'azote. Au cours du développement, leur utilisation s'effectue à une vitesse légèrement plus rapide que celle des autres substances de réserve.

Dans les jeunes plantes, les amides, la sérine, l'alanine, l'arginine et les acides glutamique et aspartique constituent généralement les composés azotés les plus abondants à l'état libre. Leurs teneurs maximales se rencontrent dans les organes vers lesquels s'effectue la migration des composés azotés issus des cotylédons : tiges et surtout racines. Dans ces parties du végétal, leur accumulation ne résulte cependant pas d'un simple transfert ; elle s'accompagne d'une transformation des composés azotés qui conduit, en particulier, à une élévation considérable des teneurs en asparagine. Par contre, l'accroissement du taux d'arginine résulterait plutôt d'une migration active et d'une métabolisation ralentie.

Les feuilles des jeunes plantes se distinguent des autres organes par une protéogénèse active et un taux très bas d'azote soluble.

Enfin, en dépit de l'orientation du métabolisme secondaire du Chêne vers les composés phénoliques, ces analyses montrent la faible importance des acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine) dans le pool azoté de ce végétal. Mais il faut souligner que dans les conditions artificielles de culture, le métabolisme de ces deux composés est affecté comme le montre l'inversion de leurs concentrations relatives.

CHAPITRE II

DONNEES SUR LA CONSTITUTION DES GALLES

A.- MATERIEL VEGETAL

B.- TENEURS EN EAU

C.- RESIDUS D'EXTRACTION

D.- GLUCIDES SOLUBLES

E.- ACIDES ORGANIQUES
- I.- COMPARAISON DE L'ACIDITE ORGANIQUE DES GALLES ET DES FEUILLES
- II.- ACIDES ORGANIQUES DES FEUILLES ET DES GALLES

F.- CONSTITUANTS AZOTES
- I.- AZOTE TOTAL
- II.- AZOTE SOLUBLE ET INSOLUBLE
- III.- ACIDES AMINES ET AMIDES LIBRES
- IV.- ORIGINE DES COMPOSES AZOTES SOLUBLES
- V.- REPARTITION DES COMPOSES AZOTES DANS LES TISSUS GALLAIRES
- VI.- COMPARAISON DES GALLES ET DES ORGANES JEUNES
- VII.- ACIDES AMINES PROTEIQUES

G.- ACIDES PHENOLIQUES
- I.- FORMES SOLUBLES
- II.- TANNINS ET RESIDU INSOLUBLE

H.- CONCLUSIONS

CHAPITRE II

DONNEES SUR LA CONSTITUTION DES GALLES

Parmi les modifications biochimiques induites chez les végétaux par l'action des insectes gallicoles, la plus anciennement connue est l'accumulation très importante, dans les cécidies, de composés phénoliques et de substances tannantes. Ces dernières ont le plus souvent retenu l'attention et les analyses, effectuées par de nombreux auteurs (cités par KIEFFER, 1897), montrent que les tannins peuvent constituer jusqu'à 75 % de la matière sèche de certaines galles de Cynipides, telles les cécidies de Cynips tinctoriae. Cette accumulation de produits aromatiques ne se limite cependant pas aux tannins, elle concerne aussi de nombreux pigments glucosidiques responsables des colorations vives des galles (MARESQUELLE et MEYER, 1965 ; BLUNDEN et CHALLEN, 1965).

Les investigations sur les autres aspects de la biochimie des cécidies furent surtout entreprises à la suite des recherches de MOLLIARD (1913). Elles sont surtout consacrées à l'étude de leurs constituants glucidiques et azotés. Certaines galles se caractérisent par la présence dans leurs cellules de dépôts massifs d'amidon (SCHNETZLER, 1963 ; MARESQUELLE et MEYER, 1965), d'autres renferment en abondance des sucres réducteurs (MOLLIARD, 1913). Leur composition azotée, toujours différente de celle du végétal attaqué, se signale, en premier lieu, par une élévation souvent considérable des valeurs du rapport $\frac{\text{N soluble}}{\text{N total}}$ (PARIS et TROTTER 1911 ; MOLLIARD, 1913 ; MONTANT, 1960 ; KIENTZLER et al., 1962 b) ; la nature des substances responsables de cette augmentation demeure toutefois inconnue dans la majorité des cas.

Quelques travaux isolés abordent l'étude de leur composition en acides nucléiques (ARYA et al., 1962), en acides organiques (KIENTZLER et al., 1962 a) et en uréides glyoxyliques (KIENTZLER et al., 1962 b) ; les données recueillies, en nombre trop restreint, ne peuvent conduire à des généralisations valables.

Cette revue bibliographique succincte montre que les recherches biochimiques, souvent anciennes, n'envisagent que quelques aspects de la constitution des galles. Elle fait aussi apparaître que les études les plus nombreuses ont été réalisées sur des galles peu différenciées induites par des Acariens (MONTANT, 1960 ; KIENTZLER et al., 1962 b) ou des Hémiptères (MOLLIARD, 1913 ; WARICK et HILDEBRANDT, 1967) sur des végétaux appartenant à des ordres très différents. Au contraire, les données concernant les galles bien structurées, engendrées par le Chêne sous l'action des Cynipides gallicoles, demeurent encore très fragmentaires ; elles ne fournissent que des indications globales sur le métabolisme azoté (PARIS et TROTTER, 1911 ; PACLT et HASSLER, 1967) ou le contenu en substances phénoliques (KUSTENMACHER, 1894) de ces productions anormales.

Dans ce chapitre, afin de comparer les galles entre elles et de déterminer la nature des troubles physiologiques induits sur le Chêne par les Cynipides

gallicoles, j'ai analysé la composition en substances azotées, en acides organiques, en glucides et parfois en acides phénoliques des cécidies provoquées par Biorhiza pallida, Cynips quercustozae, Neuroterus quercusbaccarum et Dryophanta folii dans les bourgeons ou sur les feuilles de ce végétal.

A.- MATERIEL VEGETAL

En règle générale, à chaque récolte, seules sont retenues les cécidies qui présentent des tailles sensiblement identiques. Cependant, les galles de Neuroterus récoltées les 11 mai 1967 et 16 mai 1970 étaient particulièrement hétérogènes ; elles furent donc réparties respectivement, en deux et trois lots, suivant les critères de développement suivants :

Récolte du 11/5/67

Galles "jeunes" : diamètre inférieur à 5 mm.

Galles "bien développées" : diamètre supérieur ou égal à 5 mm.

Récolte du 16/5/70

Galles "jeunes" : diamètre inférieur à 5 mm, larves à peine visibles.

Galles "bien développées" : diamètre compris entre 5 et 8 mm, larves bien visibles, rarement nymphosées.

Galles "âgées" : diamètre supérieur à 8 mm, toutes les larves nymphosées, quelques imagos.

B.- TENEURS EN EAU

Les résultats des déterminations des teneurs en eau (tableau XI) sont en accord avec les dosages de MOLLIARD (1913) sur un grand nombre d'autres cécidies: les galles sont toujours plus riches en eau que les organes normaux sur lesquels elles se développent.

Des quatre cécidies analysées dans cette étude, celle de Neuroterus possède le degré d'hydratation le plus élevé. L'autre cécidie printanière, celle de Biorhiza, renferme également une forte proportion d'eau. En revanche, les galles de Cynips et de Dryophanta, récoltées à une époque plus avancée de la période végétative de l'hôte, sont plus pauvres en eau.

Au cours de leur développement, et malgré la turgescence variable des tissus foliaires, les cécidies présentent un accroissement de leur teneur en eau ; cette augmentation, faible chez les galles de Neuroterus, est surtout bien marquée pour celles de Dryophanta.

Enfin, contrairement aux constatations de PARIS et TROTTER (1911), les teneurs en eau des feuilles parasitées ne diffèrent pas significativement, ni de façon reproductible, de celles des feuilles saines.

TABLEAU XI

Teneurs en eau des galles, des feuilles saines et parasitées (en % de la matière fraîche)

Dates des récoltes	Nature des galles	Organes analysés		
		Galles	Feuilles parasitées	Feuilles saines
14/9/66	Cynips	73,6		
3/5/69	Biorhiza	83,5		
10/7/67	Dryophanta "jeunes"	60,5	53,8	51,5
19/9/67	Dryophanta "âgées"	79,7	62,4	64,2
14/9/66	Dryophanta "âgées"	80,8	40,2	50,4
11/5/67	Neuroterus "jeunes"	90,6	67,7	70,8
	" "bien développées"	92,2		
16/5/70	Neuroterus "jeunes"	91,0	63,2	59,9
	" "bien développées"	92,6		
	" "âgées"	93,0		

C.- RESIDUS D'EXTRACTION

Pour une même masse de matière sèche, les extractions par un mélange hydroalcoolique (page 18) réalisées à partir des galles laissent persister un résidu insoluble moins abondant que celles effectuées sur les feuilles (figure 14).

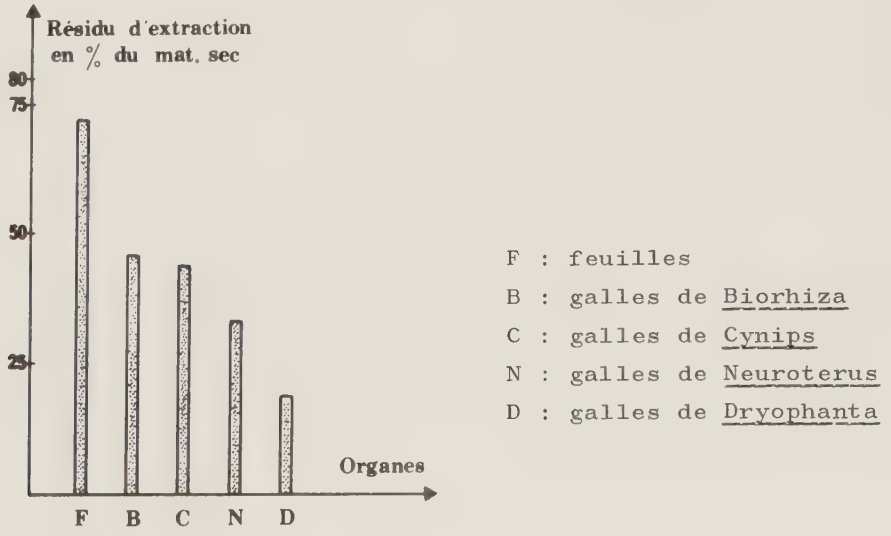


Figure 14

Pourcentages de la matière sèche non solubilisée par l'éthanol

L'alcool dissout toujours plus de la moitié de la substance des galles mais seulement 28 % environ de celles des feuilles (figure 14). Le cas extrême est constitué par les cécidies de Dryophanta folii qui sont solubles à 81 % dans l'éthanol aqueux.

Pour expliquer ces différences entre les organes sains et les galles, on peut considérer, en première approximation, que la solubilité dans l'éthanol est fonction inverse du degré de polymérisation : exception faite de l'amidon (voir page 55), les galles renferment donc proportionnellement moins de macromolécules (cellulose, lignines, protéines, acides nucléiques,...) mais davantage de substances de faibles poids moléculaires que les feuilles. Ces conclusions sont d'ailleurs en accord avec les caractéristiques histologiques et cytologiques de ces productions pathologiques : grande taille des cellules, importance de la vacuole, finesse des parois, faible abondance des tissus sclérifiés,... (MANI, 1964).

D.- GLUCIDES SOLUBLES

Le glucose, le fructose et le saccharose constituent les seuls glucides solubles des galles et des feuilles (tableau XII) ; les cécidies de Neuroterus et de Cynips sont toutefois très pauvres, ou totalement dépourvues de saccharose.

TABLEAU XII

Estimation semi-quantitative des glucides solubles présents dans les feuilles et les galles

Organes	Feuilles	Galles de : Neuroterus	Biorhiza	Dryophanta	Cynips
Glucides					
Glucose	+	+++	+++	+++	+++
Fructose	+	+++	++	++	++
Saccharose	+		++	+	

Du point de vue quantitatif, comme le montre l'appréciation visuelle de l'intensité des taches après pulvérisation des chromatogrammes par le réactif à l'aniline-diphénylamine, les formations parasitaires sont toujours plus riches que les feuilles en sucres réducteurs. Ainsi, à titre d'exemple, les galles de Neuroterus renferment environ 10 fois plus de glucose et de fructose que les feuilles sur lesquelles elles se développent.

Ces résultats confirment les données antérieures de PANTANELLI (1911), de MOLLIARD (1913) et de KIENTZLER et al. (1962 a) qui ont également attiré l'attention sur la richesse des tissus gallaires en sucres solubles. Dans les cécidies examinées par ces auteurs, cette accumulation s'effectue au détriment des macromolécules glucidiques. Chez les galles de Biorhiza, au contraire, la teneur importante en

glucides solubles va de pair avec un dépôt massif de grains d'amidon dans les tissus cécidiens (REY, 1969). L'élévation du taux des sucres réducteurs n'est donc pas toujours liée à une simplification du contenu glucidique de ces formations parasitaires.

E.- ACIDES ORGANIQUES

A ma connaissance, les seules études sur les acides organiques des tissus gallaires ont été réalisées par KIENTZLER et al. (1962 a) et LESAINT et al. (1964) respectivement chez la cécidie de Pediaspis aceris et le "Crown-gall" de Bryophyllum daigremontianum. Ce manque d'intérêt pour les acides organiques surprend. En effet, en plus de leur rôle métabolique primordial, ces composés présentent, chez les végétaux supérieurs des fluctuations très accusées de leurs teneurs sous l'influence d'un grand nombre d'attaques parasitaires (SCHNEIDER, 1964 ; BOLLARD et MATTHEWS, 1966 ; HOFFEREK, 1967 ; CAVALIÉ, 1969).Avant d'aborder l'étude des composés azotés, j'ai donc examiné le contenu de la fraction anionique des quatre galles retenues dans ce travail.

I.- COMPARAISON DE L'ACIDITE ORGANIQUE DES GALLES ET DES FEUILLES

L'acidité organique totale des cécidies s'écarte toujours nettement de celle des feuilles récoltées à la même époque (tableau XIII) : au mois de mai, l'acidité des galles de Biorhiza et de Neuroterus est très nettement supérieure à celle des feuilles, au mois de septembre, au contraire, les tissus foliaires renferment plus d'acides organiques que les cécidies estivales de Dryophanta et de Cynips. Le sens des variations semble donc conditionné au moins partiellement, par l'époque de formation des cécidies.

TABLEAU XIII

Acidités organiques des galles et des feuilles. Résultats exprimés en µeq/g mat. sec

Mois des récoltes	Nature des organes	Acidités organiques
Mai	Feuilles saines	230
	G. Neuroterus	324
	G. Biorhiza	591
Septembre	Feuilles saines	592
	G. Dryophanta	211
	G. Cynips	331

II.- ACIDES ORGANIQUES DES FEUILLES ET DES GALLES

Dans les feuilles et les galles (tableaux XIV et XV), les acides quinique, malique, citrique, succinique et oxalique constituent les composés les plus représentatifs de la fraction anionique. Qualitativement, les galles ne renferment donc, au plus, que les constituants caractérisés dans les feuilles, la recherche d'acides organiques spécifiques des tissus cécidiens ayant toujours été négative.

TABLEAU XIV

Teneurs en acides organiques des galles et des feuilles récoltées au cours du mois de mai. Résultats exprimés en µM/g de mat. sec

Nature des organes	Feuilles saines	Galles de : Neuroterus	Galles de : Biorhiza
Dates des récoltes	13/5/69	13/5/69	3/5/69
Acides organiques*			
Ac. shikimique	5,82	1,39	0
Ac. quinique	151,17	80,54	15,77
Ac. glycérique + Ac. glycolique	7,08	0	8,82
Ac. succinique	2,46	3,56	0,71
Ac. malique	22,55	108,41	242,70
Ac. citrique	3,08	5,29	23,32
Ac. tartrique	0,55	0	0,15
Total	192,71	199,19	291,47

* L'acide oxalique, absent des feuilles jeunes, n'a pas été recherché dans les galles.

Du point de vue quantitatif, le fait le plus saillant réside dans la grande similitude de composition des cécidies développées à une même époque de l'année, bien que la nature de l'agent inducteur et celle de l'organe attaqué soient différentes.

Les cécidies printanières de Neuroterus et de Biorhiza (tableau XIV) se caractérisent par leurs fortes teneurs en acides malique, quinique et citrique et par leur pauvreté en acide shikimique. L'acide malique constitue toujours le composé prépondérant ; nettement plus abondant que l'acide quinique, il est pour une grande part responsable de la forte acidité de ces galles.

Dans les cécidies récoltées au mois de septembre (tableau XV), les acides quinique et malique sont également les composés majeurs de la fraction anionique mais, à l'inverse des galles printanières, l'acide quinique prévaut sur l'acide malique.

TABLEAU XV

Teneurs en acides organiques des galles et des feuilles récoltées au mois de septembre. Résultats exprimés en µM/g de mat. sec

Nature des organes	Feuilles saines	Feuilles parasitées	Galles de : Dryophanta	Cynips
Date des récoltes	14/9/66	14/9/66	14/9/66	14/9/66
Ac. organiques				
Ac. shikimique	0	0	31,94	18,30
Ac. quinique	95,40	103,00	107,37	182,37
Ac. glycérique + Ac. glycolique	+	+	4,56	6,42
Ac. succinique	6,62	16,50	0,57	1,23
Ac. malique	117,00	53,00	30,90	51,93
Ac. citrique	18,46	13,13	1,44	5,90
Ac. tartrique	6,60	0	0	0
Ac. oxalique	66,35	63,25	0	0
Total	310,43	248,88	176,78	266,15

Les galles de Dryophanta et de Cynips se différencient également des cécidies prélevées au mois de mai par leur taux élevé d'acide shikimique ; ce composé alicyclique surpasse toujours nettement l'acide citrique et peut même être aussi abondant que l'acide malique.

Les différences observées entre les acidités organiques totales des diverses galles (tableau XIII) selon l'époque de leur récolte, ne résultent donc pas uniquement d'une variation des teneurs ; elle provient aussi d'une modification des proportions relatives des divers constituants de la fraction anionique.

Malgré les fluctuations du contenu en acides organiques des feuilles, entre les mois de mai et de septembre, il faut souligner que la composition des galles foliaires (tableaux XIV et XV) n'est pas le simple reflet de celle des feuilles. Les cécidies se distinguent toujours des organes de référence par une inversion des valeurs des rapports $\frac{\text{teneurs en quinate}}{\text{teneurs en malate}}$ ou $\frac{\text{teneurs en shikimate}}{\text{teneurs en citrate}}$. Lorsque les acides alicycliques sont très abondants dans les feuilles (tableau XIV), les intermédiaires du cycle de KREBS constituent les composés prépondérants des galles et réciproquement (tableau XV).

De ce point de vue, il est très curieux de constater que les galles formées sur les feuilles âgées (galles de Dryophanta) possèdent une composition en acides organiques proche de celles des feuilles jeunes ; à l'inverse, les cécidies portées par des feuilles jeunes (galles de Neuroterus) présentent une constitution voisine de celle des feuilles âgées.

Les différences quantitatives entre les feuilles et les galles sont encore accentuées par l'absence complète d'acide oxalique (tableau XV) dans les galles estivales de Dryophanta et de Cynips, alors qu'à cette époque de l'année ce composé existe en quantités notables dans les feuilles saines. Par cet aspect de leur composition, les galles du Chêne se distinguent de celles induites par Agrobacterium tumefaciens sur Bryophyllum daigremontianum. Dans ces tumeurs, l'acide oxalique, pourtant absent des feuilles de la plante saine, constitue une fraction importante de l'acidité organique totale des galles. KIENTZLER et al. (1962 a) ont également décelé en abondance, ce diacide dans les galles provoquées par l'Hyménoptère Cynipide Pediaspis aceris sur Acer pseudoplatanus. Les galles de Dryophanta et de Cynips semblent donc dépourvues des systèmes enzymatiques nécessaires à la biosynthèse de l'acide oxalique. Son absence démontrerait également une impossibilité de migration à partir des feuilles, due sans doute à la forme, cristaux d'oxalate de calcium (CROMBIE, 1960), sous laquelle il s'y trouve.

L'action des galles foliaires sur leur support entraîne, par rapport aux feuilles saines, une diminution des teneurs totales en acides organiques (tableau XV). Elle se manifeste également par l'existence dans les organes parasités de taux intermédiaires entre ceux des feuilles saines et des galles ; le comportement des acides quinique, malique et citrique est particulièrement significatif à cet égard. Ce phénomène sera à nouveau considéré lors de l'étude des acides aminés.

F.- CONSTITUANTS AZOTES

I.- AZOTE TOTAL

Les taux d'azote total des différentes cécidies analysées varient dans des proportions considérables (tableau XVI). Les galles de Biorhiza présentent les teneurs les plus élevées (3,20 %), celles de Dryophanta se signalent par leur très grande pauvreté (0,37 à 0,21 %).

Il ressort des études comparatives que les cécidies foliaires possèdent des teneurs inférieures à celles des feuilles récoltées à la même époque. Ce fait est particulièrement net pour les galles de Dryophanta chez lesquelles le taux d'azote du tissu cécidien âgé n'est que le dixième de celui des tissus sains. Pour les galles de Neuroterus les écarts, moins accusés, demeurent cependant significatifs. Mes résultats diffèrent, en ce cas, de ceux de PACLT et HASSLER (1967) et de PARIS et TROTTER (1911) qui ont mis en évidence une concentration plus importante d'azote total dans les tissus gallaires que dans les feuilles.

Pour expliquer ces divergences on peut, en premier lieu, incriminer l'état de développement des cécidies analysées. En effet, le taux d'azote total des galles jeunes (galles de Neuroterus récoltées le 16/5/70 et de Dryophanta) est nettement supérieur à celui des cécidies plus âgées qui ont servi à la plupart des dosages effectués dans ce travail.

Comme les galles foliaires, les cécidies des bourgeons renferment aussi des taux très différents d'azote total (entre 0,55 et 3,20 %). On peut donc en conclure qu'il n'existe pas de relation entre la nature de l'organe parasité et la composition

azotée globale des cécidies. Par contre, les galles dont le plein développement n'est atteint qu'à une époque avancée de la période végétative (galles de Dryophanta, de Cynips) renferment toujours un pourcentage moindre d'azote total que les galles printanières (cécidies de Biorhiza, de Neuroterus). Ce résultat semble indiquer que l'état physiologique de la plante-hôte exerce une influence primordiale sur la constitution azotée de la formation parasitaire.

TABLEAU XVI

Teneurs en azote total, soluble et insoluble des galles, des feuilles saines et parasitées. Résultats exprimés en % du matériel sec

Dates des récoltes	Nature des organes	N total	N insoluble	N soluble
14/9/66	G. Cynips	0,55	0,38	0,17
3/5/69	G. Biorhiza	3,20	1,81	1,39
	G. Dryophanta "jeunes"	0,37	0,27	0,10
10/7/67	F. parasitées	2,60	2,50	0,10
	F. saines	2,80	2,70	0,10
	G. Dryophanta "âgées"	0,21	0,11	0,10
19/9/67	F. parasitées	1,88	1,80	0,08
	F. saines	2,00	1,92	0,08
	G. Dryophanta "âgées"	0,25	0,17	0,09
14/9/66	F. parasitées	2,00	1,82	0,18
	F. saines	2,30	2,20	0,10
	G. Neuroterus	2,82	1,13	1,69
20/4/69	F. parasitées	3,20	3,02	0,18
	F. saines	3,49	3,30	0,19
	G. Neuroterus "bien développées"	2,77	0,96	1,81
11/5/67	F. parasitées	3,45	3,25	0,20
	F. saines	3,40	3,22	0,18
	G. Neuroterus "jeunes"	3,59	1,56	2,03
16/5/70	G. Neuroterus "bien développées"	3,24	1,23	2,01
	G. Neuroterus "âgées"	2,94	1,14	1,77

Enfin, dans la majorité des cas, les taux d'azote total contenu dans les feuilles parasitées sont légèrement inférieurs à ceux des feuilles saines. Cependant, l'examen du tableau XVI montre que les différences sont peu accusées et ne peuvent être prises en considération que par suite de leur fréquence. Ces résultats sont à relier au peu de toxicité de cette forme de parasitisme : à part un cas isolé d'at-

taque massive de jeunes Chênes par des Cynipides (KIEFFER, 1897) on n'a jamais mis en évidence d'influence léthale des zoocécidies sur leur plante-hôte.

II.- AZOTE SOLUBLE ET INSOLUBLE

La détermination des quantités d'azote contenues dans les composés solubles et insolubles fait apparaître une différence fondamentale entre les feuilles et les galles (tableau XVII). Dans les premières, l'azote insoluble représente toujours plus de 94 % de l'azote total ; dans les galles, au contraire, il décroît considérablement au profit des substances azotées solubles qui constituent parfois plus de la moitié des composés azotés totaux (galles de Neuroterus).

TABLEAU XVII

Valeurs du rapport $\frac{\text{N soluble x 100}}{\text{N total}}$

Dates des récoltes	Nature des galles	Organes analysés		
		Galles	Feuilles parasitées	Feuilles saines
14/9/66	Cynips	30,9		
3/5/69	Biorhiza	43,4		
10/7/67	Dryophanta "jeunes"	27,0	3,8	3,5
19/9/67	Dryophanta "âgées"	47,6	4,2	4,0
14/9/66	Dryophanta "âgées"	36,0	9,0	4,3
20/4/67	Neuroterus	59,9	5,6	5,4
11/5/67	Neuroterus	65,3	5,8	5,3

Ces résultats confirment, dans le cas des galles du Chêne, les données obtenues sur de nombreuses autres cécidies (PARIS et TROTTER, 1911 ; MOLLIARD, 1913 ; MONTANT, 1960 ; KIENTZLER et al., 1962 b). Ils montrent que l'augmentation des composés azotés solubles, au détriment des protéines, constitue une caractéristique commune à tous les tissus cécidiens. Il faut pourtant souligner les variations importantes (de 27 à 65 %) des valeurs du rapport $\frac{\text{N soluble}}{\text{N total}}$ selon la galle analysée. La teneur en composés azotés solubles ne dépend donc pas uniquement du taux d'azote total ; elle est aussi influencée par de nombreux autres facteurs parmi lesquels la spécificité d'action du parasite, l'état de développement de la cécidie, l'état physiologique de la plante-hôte jouent sans doute un rôle important.

Par rapport aux feuilles saines récoltées à la même date (tableau XVI), l'influence des galles foliaires sur leur support se manifeste surtout par une diminution du taux d'azote insoluble. Les teneurs en azote soluble restent pratiquement

inchangées ce qui entraîne une élévation des valeurs du rapport $\frac{N \text{ soluble}}{N \text{ total}}$ (tableau XVII). Pourtant, comme dans le cas de l'azote total, les différences sont peu accusées et ne deviennent significatives que par suite de leur généralité. Il est aussi possible que ces faibles variations soient dues au fait que les feuilles attaquées portent un nombre variable de cécidies et sont, par conséquent, diversement affectées par le parasitisme. Ces résultats demanderaient donc à être confirmés en analysant uniquement des feuilles portant un nombre élevé de galles.

III.- ACIDES AMINES ET AMIDES LIBRES

La nature des composés azotés, dont l'accumulation dans les tissus cécidiens provoque l'augmentation caractéristique du rapport $\frac{N \text{ soluble}}{N \text{ total}}$, demeure encore dans la majorité des cas, inconnue. Pourtant, dès 1913, MOLLIARD mit en évidence une accumulation d'asparagine et d'autres substances aminées dans les galles induites par Schizoneura lanuginosa sur les feuilles de l'Orme. Les études ultérieures ne purent cependant confirmer ces résultats préliminaires. En effet, si toutes les investigations ont permis de détecter des modifications importantes de la composition aminée des galles par rapport aux tissus sains (MONTANT, 1960 ; WARICK et HILDEBRANDT, 1967), on ne trouve que rarement mention dans la littérature d'une élévation notable du taux d'asparagine ou des acides aminés libres (GUPTA et al., 1962 ; GADAL et al., 1968 b). L'action du parasite peut même se traduire par une très nette diminution de leurs concentrations (KIENTZLER et al., 1962 a et b).

Les teneurs totales en acides aminés et amides libres des cécidies étudiées varient dans des proportions considérables (tableau XVIII) : les plus riches, celles de Biorhiza, renferment par unité de masse sèche environ 25 fois plus de composés aminés solubles que les plus pauvres (cécidies de Dryophanta). Comme dans le cas des composés azotés totaux, les plus fortes teneurs se rencontrent dans les galles printanières ; les cécidies estivales en contiennent des taux considérablement plus réduits. A ce propos, il est intéressant de noter que les galles foliaires les plus riches en composés aminés solubles (galles de Neuroterus) se développent sur des feuilles jeunes, également bien pourvues en acides aminés libres.

A une même époque, l'azote des acides aminés et des amides constitue toujours une fraction plus importante de l'azote soluble chez les galles que chez les feuilles. Les différences les plus nettes par rapport aux organes sains se rencontrent dans les galles de Dryophanta. Dans celles de Neuroterus et surtout de Biorhiza, les pourcentages deviennent très élevés ; les acides aminés et amides constituent la très grande majorité des composés azotés solubles totaux. Enfin, seule la galle de Cynips présente une valeur du rapport $\frac{N \text{ des acides aminés}}{N \text{ soluble}}$ relativement faible et renferme donc des quantités appréciables d'autres composés azotés solubles. Il ne s'agit pas de substances protidiques, car la recherche des acides aminés constitutifs des peptides a seulement permis de caractériser de faibles quantités de glycocolle, de leucine, de tyrosine et de phénylalanine.

Un examen plus détaillé des résultats (tableau XVIII) permet de constater que les composés aminés les mieux représentés à l'état libre dans les feuilles : amides, sérine, acides glutamique et aspartique, alanine sont également les substances azotées prépondérantes des galles. L'arginine constitue toutefois une exception :

TABLEAU XVIII

Teneurs en acides aminés et amides libres des feuilles saines, des feuilles parasitées et des galles. Résultats exprimés en µM/g de matériel sec

Dates des récoltes	3/5/69	14/9/66	11/5/67			14/9/66		
Organes	Galles Biorhiza	Galles Cynips	Feuilles saines	Feuilles parasitées	Galles Neuroterus	Feuilles saines	Feuilles parasitées	Galles Dryophanta
Ac. aminés et amides								
Asp NH_2	381,70	6,53	14,78	14,94*	315,08	0,82	1,48	6,45
Glu NH_2	16,84	2,74	1,74		6,90	0,90	1,55	3,94
Ser	23,17	6,13	6,35	4,19	4,47	0,93	1,53	1,77
Glu	11,97	5,04	4,52	4,70	7,74	2,30	1,40	1,78
Asp	29,47	2,84	5,92	6,29	8,83	1,76	1,30	1,10
Ala	32,98	6,23	3,75	5,06	11,79	1,06	1,23	1,18
Arg	5,37	3,20	0,46	0,52	34,66	0,08	0,44	2,00
Pro	0,00	2,21	0,73	0,77	0,00	0,30		0,37
Lys	1,65	0,23	0,26	0,22	3,15	0,60	0,55	0,11
His	2,52	0,25	0,16	0,07	3,15	0,08	0,11	0,59
Gly	2,91	0,51	0,27	2,42	1,45	0,35	0,34	0,19
Thr	1,77	0,84	0,80	0,77	2,42	0,24	0,33	0,36
Val	3,95	0,67	0,49	0,55	3,87		0,15	0,40
Ile	1,08	0,32	0,26	0,30	2,66	0,08	0,19	0,28
Leu	0,95	0,15	0,24	0,29	1,21	0,08	0,18	0,16
Tyr	1,13	+	0,35	0,39	1,75	0,12	0,33	0,10
Phe	2,34	0,13	0,29	0,29	0,78	0,14	0,31	0,11
Try	0	0	0	0	0,97	0	0	0,81
Total	519,80	38,02	41,37	41,77	410,88	9,84	11,42	21,70
% N soluble	94,5	37,9	46,5	40,4	69,8	17,5	12,8	62,5

* Cette valeur représente la somme des deux amides.

ce dérivé guanidique présent en faibles quantités dans les feuilles se révèle l'un des composés azotés majeurs des galles.

Malgré ces similitudes, les quantités mais aussi les proportions relatives des différents acides aminés présentent des variations considérables. Dans toutes les cécidies (tableau XVIII et figure 15), l'asparagine est le composé aminé prépondérant à l'état libre, même lorsque les feuilles parasitées renferment cette amide en quantités moindres que la glutamine (galles de Dryophanta). Son importance est pourtant très inégale selon les cécidies étudiées. Dans celles de Cynips, guère plus abondante que la sérine et l'alanine, elle ne représente que 17 % environ des composés aminés totaux. Dans les galles de Dryophanta, son intervention quantitative devient plus marquante et elle constitue une fraction élevée (29 %) des aminoacides et amides. On ne peut cependant mettre en évidence une véritable accumulation de l'asparagine que dans les galles, par ailleurs, très riches en composés azotés solubles : cécidies de Neuroterus et de Biorhiza (tableau XVIII et figure 15).

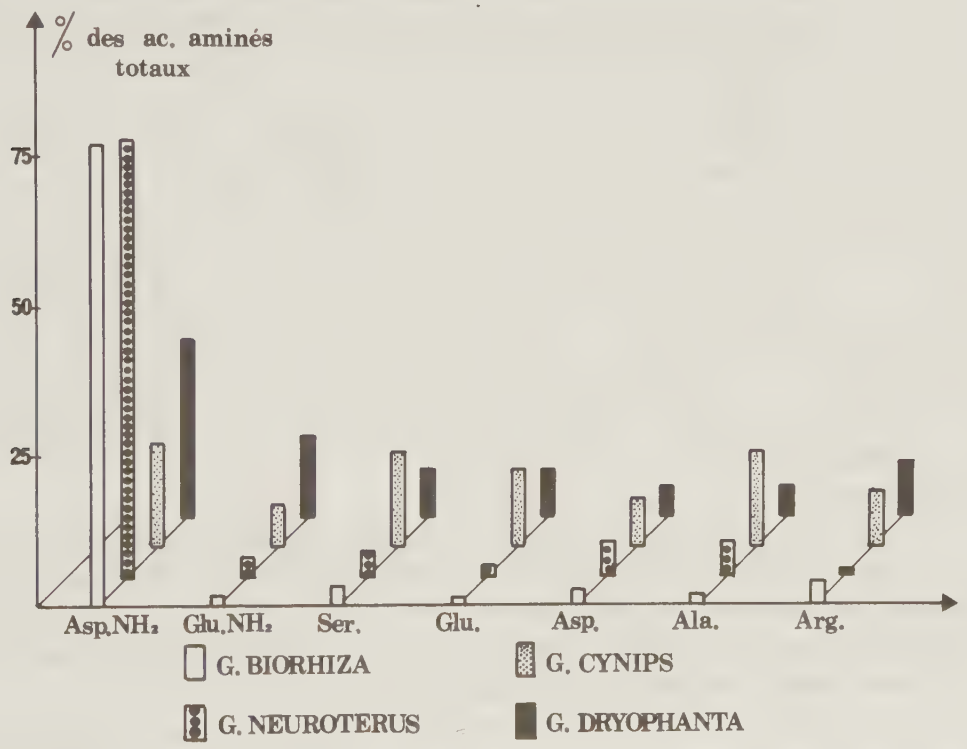


Figure 15

Importance relative des principaux acides aminés et amides contenus dans les galles

A ce propos, il faut signaler ici la similitude inattendue de composition azotée entre ces galles printanières et les racines des jeunes plantes de Q. pedunculata (tableaux IV, VII et VIII). En effet, les deux types d'organes se caractérisent par une valeur élevée du rapport $\frac{N \text{ soluble}}{N \text{ total}}$ et renferment des quantités notables de composés aminés solubles parmi lesquels prédominent l'asparagine et l'arginine.

Dans une étude sur le métabolisme azoté des galles induites par Exobasidium rhododendri et Eriophyes alpestris sur Rhododendron ferrugineum, MONTANT (1960) constate que les deux cécidies diffèrent des organes sains par une inversion des valeurs du rapport $\frac{\text{acide glutamique}}{\text{acide aspartique}}$: l'acide aspartique est le plus abondant dans les galles alors que l'acide glutamique prédomine largement dans les feuilles.

Pour le Chêne, au contraire, les galles et les feuilles récoltées à une même époque de l'année renferment des proportions tout à fait comparables des deux acides aminés dicarboxyliques (tableau XIX). Dans tous les cas, l'acide aspartique domine dans les organes récoltés au mois de mai tandis que l'acide glutamique le surpasse au mois de septembre.

TABLEAU XIX

Valeurs du rapport $\frac{\text{acide glutamique}}{\text{acide aspartique}}$ dans les feuilles et les galles

Mois des récoltes	Mai	Septembre
Organes		
Feuilles	0,76	-
G. Neuroterus	0,87	-
G. Biorhiza	0,89	-
Feuilles	-	1,30
G. Dryophanta	-	1,61
G. Cynips	-	1,77

Il semble donc que dans les galles du Chêne, les systèmes enzymatiques permettant la métabolisation des deux acides aminés dicarboxyliques ne soient pas gravement perturbés par le parasitisme.

Dans les cécidies comme dans les feuilles, la tyrosine et la phénylalanine n'existent qu'à l'état de traces. La présence de tryptophane en quantités non négligeables dans les galles de Neuroterus et de Dryophanta est pourtant à souligner en raison de son rôle dans la biosynthèse de l'acide indolylacétique, hormone susceptible d'intervenir dans la cécidogénèse (NYSTERAKIS, 1946).

L'influence des galles foliaires, sur la composition en acides aminés ou amides des feuilles, demeure toujours très limitée comme le montrent les faibles différences dans les teneurs totales entre les feuilles saines et les feuilles parasitées. De l'examen du tableau XVIII il ressort cependant, avec une grande régularité, que les teneurs en substances azotées des organes attaqués tendent à se rapprocher de celles des galles. Une élévation ou un abaissement des concentrations en acides aminés dans les galles, par rapport aux feuilles saines, s'accompagne le plus souvent d'une variation de même sens dans les feuilles parasitées : le cas de l'acide aspartique fournit un exemple particulièrement significatif à cet égard (récoltes du 11/5/67 et du 14/9/66).

Pour certaines catégories de composés, substances azotées et acides organiques, les feuilles parasitées possèdent donc une composition intermédiaire entre celles des feuilles saines et celle des galles. Ce fait est à rapprocher des observations de MOLLIARD (1913) qui a montré que les tiges portant les feuilles parasitées par Schizoneura lanuginosa possèdent certaines caractéristiques anatomiques des tissus gallaires. Il semble donc que l'action du parasite ne se limite pas strictement aux tissus cécidiens mais qu'elle induise également des modifications plus ou moins profondes de la structure et de la composition des organes voisins de la cécidie.

IV.- ORIGINE DES COMPOSES AZOTES SOLUBLES

Deux hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer l'accumulation des composés azotés solubles dans les tissus gallaires :

- pour MOLLIARD (1913), elle résulte d'une hydrolyse des protéines de la cécidie sous l'influence des enzymes protéolytiques libérées par le parasite au cours de son cycle larvaire.
- PARIS et TROTTER (1911) pensent à la suite de PANTANELLI (cité par MOLLIARD, 1913), qu'elle provient au contraire, d'une incorporation restreinte dans les macromolécules, des substances de migration provenant de la plante-hôte.

Ces deux hypothèses continuent a être discutées à l'heure actuelle (BRONNER, 1969). J'ai donc tenté de déterminer, dans le cas des galles du Chêne, la nature du processus mis en jeu. Pour ce faire, j'ai suivi l'évolution du contenu azoté des galles de Neuroterus en fonction de leur état de développement. Ces cécidies ont été retenues en raison de leur richesse en composés azotés solubles.

L'augmentation de masse des galles (tableau XX), au cours du cycle larvaire de l'insecte, s'accompagne d'une élévation importante des quantités d'azote total, soluble et insoluble qu'elles renferment (figure 16).

TABLEAU XX

Augmentation des masses au cours de la croissance des galles de Neuroterus. Récolte du 16/5/70

Stades	Masse de 100 galles en g	
	Matériel frais	Matériel sec
"Jeunes"	6,500	0,569
"Bien développées"	14,900	1,103
"Agées"	26,600	1,872

Tout au long de sa croissance, la cécidie reçoit donc, en quantités importantes, des composés azotés en provenance de la plante-hôte. La baisse sensible des teneurs (tableau XVI, page 59, galles de Neuroterus et de Dryophanta) montre cependant que la vitesse de cet afflux, maximale dans les cécidies jeunes, s'atténue ensuite pour devenir inférieure à celle des substances hydrocarbonées.

Si l'on retient l'hypothèse formulée par MOLLIARD pour expliquer l'accumulation des composés azotés solubles, on est en droit de supposer qu'à toute augmentation de la quantité d'azote soluble doit correspondre une diminution équivalente des protéines. Dans la cécidie de Neuroterus, au contraire, ces deux catégories de composés évoluent de façon sensiblement identique : l'élévation des quantités d'azote soluble est accompagnée d'un accroissement de la richesse en protéines (figure 16).

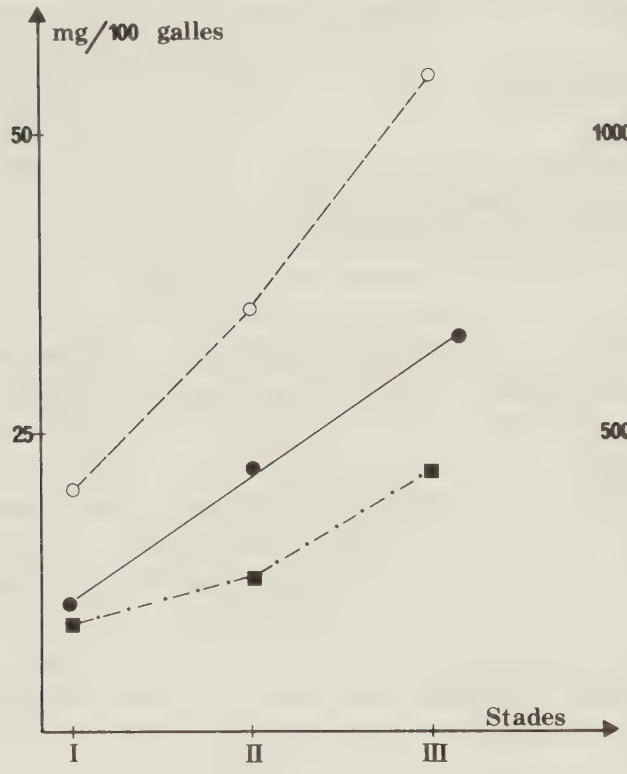


Figure 16

Variations des formes azotées des galles de Neuroterus au cours de leur croissance

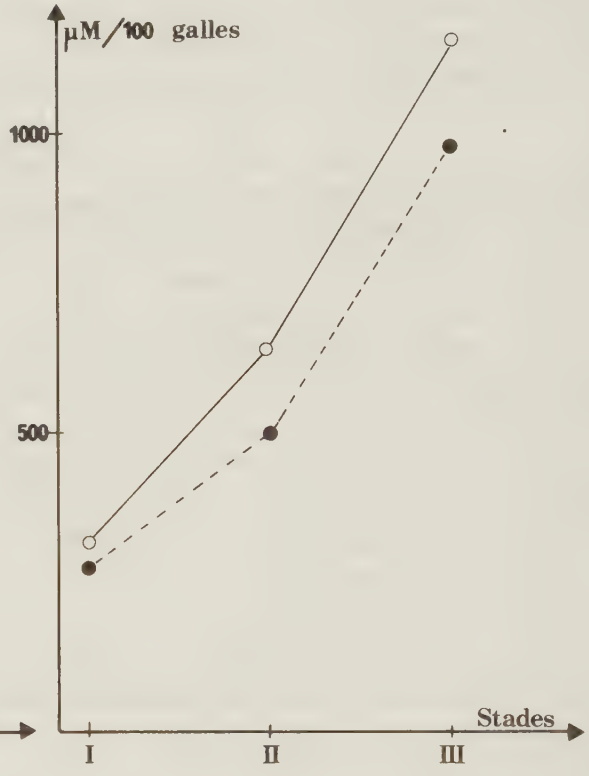


Figure 17

Variations des acides aminés libres ○——○ et de l'asparagine ●----● des galles de Neuroterus

N total ○-----○ N soluble ●——● N insoluble ■-·-·-■

Stade I : galles "jeunes - Stade II : galles "bien développées"
Stade III : galles "âgées".

Ce résultat semble exclure, chez cette galle, une intervention prépondérante des enzymes protéolytiques. La quantité initiale de protéines est d'ailleurs nettement insuffisante pour justifier le contenu final de la cécidie en composés azotés solubles (figure 16). Il suggère, au contraire, que la galle est le siège d'une arrivée importante de substances azotées solubles. Une synthèse protéique insuffisamment intense (faibles teneurs en protéines) ne parviendrait à les intégrer que partiellement dans les macromolécules protéiques ; il en subsisterait une fraction

élevée à l'état libre.

Pour confirmer l'hypothèse de PARIS et TROTTER, on peut aussi s'appuyer sur la composition et l'évolution très comparables du contenu azoté des galles printanières et des racines des jeunes chênes. Pour ces derniers organes en effet, les constituants aminés solubles proviennent indiscutablement d'une migration à partir des réserves cotylédonaires. Or, on assiste au cours du développement des racines, comme au cours de la croissance des galles de Neuroterus, à une augmentation régulière des quantités de protéines, de composés azotés solubles, d'acides aminés et amides libres et notamment, de l'asparagine et de l'arginine. Cette abondance de l'amide et du dérivé guanidique montre, de plus, que les formations parasitaires, comme le végétal sain (STEWART et DURZAN, 1965), utilisent les mêmes mécanismes de stockage de l'excédent d'azote contenu dans leurs tissus.

Dans le cas des cécidies, on pouvait penser, en toute logique, que la translocation s'effectue à partir des feuilles parasitées. Or, l'examen des tableaux XVI, XVII et XVIII fait ressortir que très souvent l'accumulation d'un composé azoté dans la cécidie n'entraîne pas de diminution importante dans les feuilles parasitées : l'abondance des amides dans les galles de Neuroterus n'affecte pas sensiblement leurs teneurs dans les feuilles. Pour expliquer cette faible action du parasitisme sur le taux des composés azotés solubles des feuilles, plusieurs hypothèses sont possibles. On peut envisager :

- une synthèse accrue de certains acides aminés dans les feuilles parasitées,
- une libération active à partir des protéines foliaires ; on note, en effet, une légère diminution des teneurs en azote protéique dans les feuilles attaquées (tableau XVI, page 59),
- une intervention de tous les organes de la plante dans la nutrition de la galle.

Cette éventualité paraît la plus plausible ; elle a déjà été vérifiée dans le cas des glucides par FOURCROY et BRAUN (1967). En effet, ces auteurs ont montré que la galle d'Aulax glechomae constitue un lieu d'attraction des substances glucidiques synthétisées dans les feuilles saines du rameau gallifère de Glechoma hederacea. Selon cette hypothèse, les feuilles joueraient surtout un rôle dans le transport des métabolites élaborés par le reste de la plante ; ceci pourrait expliquer les faibles modifications de leur composition lorsqu'elles sont porteuses de galles.

Enfin, la comparaison des valeurs reportées dans les tableaux XI, XVI et XVII permet d'établir un rapport original entre le degré d'hydratation des cécidies et leur contenu en composés azotés :

- à une exception près (tableau XXI), les teneurs en eau et les valeurs du rapport $\frac{N \text{ soluble}}{N \text{ total}}$ varient dans le même sens ; une turgescence élevée semble favoriser l'accumulation des composés azotés solubles au détriment des polymères insolubles.
- les galles les plus riches en eau (Biorhiza, Neuroterus) renferment également les plus fortes teneurs en composés azotés.

Pour tenter d'expliquer cette dernière corrélation, on peut concevoir qu'une arrivée abondante de sève, à partir de la plante-hôte, constitue un facteur favorable à l'entrée dans la galle, à la fois de quantités importantes d'eau et de métabolites solubles. Il est dès lors probable que les fortes teneurs en azote total et soluble des galles printanières proviennent du fait qu'elles bénéficient, au même

titre que les organes en pleine croissance, de l'afflux de substances azotées de réserve provenant des tiges et des racines lors de la reprise de la végétation.

Si cette éventualité permet d'apporter une explication aux phénomènes mis en évidence dans cette étude, elle offre néanmoins l'inconvénient de ne considérer les galles que comme des organes d'accumulation dépourvus, de tout moyen efficace de contrôle de la pénétration des métabolites provenant de la plante parasitée.

TABLEAU XXI

Comparaison des teneurs en eau et des valeurs du rapport $\frac{\text{N soluble x 100}}{\text{N total}}$

Dates des récoltes	Nature des galles	Teneur en eau en % du matériel frais	$\frac{\text{N sol. x 100}}{\text{N total}}$
10/7/67	Dryophanta "jeunes"	60,5	27,0
14/9/66	Cynips	73,6	30,9
19/7/67	Dryophanta "âgées"	79,7	44,2
14/9/66	Dryophanta "âgées"	80,8	36,0
3/5/69	Biorhiza	83,5	43,4
11/5/67	Neuroterus	90,6	61,4

V.- REPARTITION DES COMPOSES AZOTES DANS LES TISSUS GALLAIRES

Dans l'organisation interne des galles de Cynipides, le tissu nourricier constitue la partie de la galle directement en contact avec la larve. Généralement séparé du reste de la cécidie par une zone sclérenchymateuse (voir chapitre Matériel et méthodes, figure 1, page 11), ce tissu se signale par sa cytologie spéciale typique des cellules très actives : richesse cytoplasmique, fragmentation vacuolaire hypertrophie nucléaire,... (MARESQUELLE et MEYER, 1965). En relation avec son rôle primordial, l'alimentation de la larve, ce tissu renferme généralement en abondance de l'amidon, des gouttelettes lipidiques et parfois ces deux formes de réserves simultanément (REY, 1969). En revanche, les protéines ne semblent pas s'accumuler dans les tissus nourriciers ; à l'heure actuelle, la présence de grains d'aleurone n'a jamais été signalée au voisinage du parasite (MARESQUELLE et MEYER, 1965).

Les teneurs en azote total des différentes parties des galles de Dryophanta et de Biorhiza confirment ces données histochimiques. En effet, les composés azotés totaux sont présents à des taux identiques dans l'ensemble de la galle de Biorhiza (tableau XXII). On relève, certes, l'existence d'une teneur plus faible dans la partie externe de la galle de Dryophanta que dans le tissu nourricier mais, il faut souligner que chez cette cécidie, la zone proche du parasite reste néanmoins très pauvre (0,48 %).

TABLEAU XXII

Teneurs en azote total des différents tissus des galles.
Résultats exprimés en % du matériel sec

Nature des galles	Nature des tissus	N total	N insoluble	N soluble	N sol. x 100 / N total
Dryophanta	Tissu nourricier	0,48	0,31	0,17	35,0
	Reste de la galle	0,16	0,09	0,07	44,0
Biorhiza	Tissu nourricier	2,82	1,81	1,01	35,8
	Reste de la galle	2,82	1,50	1,32	46,8

Pourtant, si on ne peut mettre en évidence une accumulation de composés azotés dans les tissus nourriciers, l'examen des résultats fait apparaître une grande hétérogénéité dans la composition des différents tissus gallaires :

- elle se manifeste d'abord dans le contingent azoté total par une proportion plus élevée d'N insoluble dans la zone proche du parasite (environ 65 %) ; les composés azotés solubles prennent, en revanche, une importance plus grande (entre 44 et 47 %) dans le reste de la galle.

- elle apparaît également dans la teneur en acides aminés et amides libres (tableau XXIII). Dans ce cas, les résultats pris dans leur ensemble sont contradictoires. En effet, si le tissu nourricier des galles de Dryophanta est plus riche en composés aminés libres que le reste de la galle, on rencontre exactement la situation inverse dans la cécidie de Biorhiza.

Cette divergence est due aux teneurs très élevées en amides et surtout en asparagine du parenchyme banal de la galle de Biorhiza. Exception faite des deux amides (tableau XXIII), les tissus nourriciers des deux cécidies possèdent les concentrations maximales en acides aminés libres. Les écarts les plus nets par rapport aux autres tissus gallaires portent sur les teneurs en acide glutamique, arginine, proline, histidine, thréonine et valine. Dans la galle de Biorhiza, l'excédent d'asparagine est stocké dans les tissus éloignés du parasite ; les composés azotés plus directement utilisables par l'insecte se localisent préférentiellement dans le tissu nourricier.

Par des techniques histochimiques, BRONNER et MEYER (1968) et BRONNER (1969) ont également étudié la répartition des composés aminés solubles dans des galles de Cécidomyides et de Cynipides tels, par exemple, Perrisia galii , P. urticae, Andricus incurvator et Aulax glechomae. Ils observent aussi une grande richesse au niveau des tissus nourriciers, mais à l'inverse des résultats obtenus ici, ils constatent une absence pratiquement complète de composés aminés solubles dans le reste de la galle.

TABLEAU XXIII

Teneurs en acides aminés et amides libres des différents tissus des galles. Résultats exprimés en µM/g de mat. sec

Nature des galles	Dryophanta		Biorhiza	
Nature des tissus	Tissu nourricier	Autres tissus	Tissu nourricier	Autres tissus
Ac. aminés et amides				
Asp NH_2	6,57	5,31	169,85	312,35
Glu NH_2	3,57	2,23	17,60	23,40
Ser	4,05	2,50	10,60	13,95
Glu	7,32	1,79	18,55	8,85
Asp	4,68	1,73	20,75	21,65
Ala	2,50	1,11	8,85	7,05
Arg	3,04	1,79	22,65	11,65
Pro	3,45	0,74	3,70	1,70
Lys	0,68	0,43	1,65	1,45
His	1,03	0,28	4,10	1,55
Gly	0,50	0,12	1,85	1,55
Thr	1,18	0,38	5,45	2,35
Val	1,25	0,44	2,50	1,85
Ile	0,75	0,23	1,00	0,90
Leu	0,83	0,12	1,05	0,65
Tyr	1,07	0,11	1,00	1,15
Phe	1,27	0,08	2,00	1,60
Total	43,74	19,39	293,15	413,65
Total sans amides	33,60	11,85	105,70	77,90

Pour expliquer ces différences on peut :

- soit invoquer une répartition dissemblable des composés azotés solubles à l'intérieur des tissus des diverses galles étudiées,

- soit mettre en cause les techniques analytiques : extraction et dosage dans un cas, coloration des coupes à la ninhydrine dans l'autre cas.

Pour déterminer la validité de l'une ou de l'autre de ces deux hypothèses, il sera donc nécessaire de comparer les résultats fournis par l'application de ces deux techniques à un même matériel végétal.

VI.- COMPARAISON DES GALLES ET DES ORGANES JEUNES

PARIS et TROTTER (1911), puis SALGUES (1959) ont assimilé les cécidies en activité à des organes jeunes, "plus jeunes que les organes normaux qui leur ont donné naissance" (SALGUES, 1959). Certains résultats obtenus dans cette étude confirment cette manière de voir : comme les feuilles jeunes, les galles foliaires possèdent des degrés d'hydratation élevés et des teneurs importantes en azote soluble et en acides aminés libres (tableaux II, XVI et XXIV).

TABLEAU XXIV

Evolution des teneurs en acides aminés libres des feuilles et des galles au cours du vieillissement des organes. Résultats exprimés en µM/g de mat. sec

Nature des organes	Feuilles		Galles de : Dryophanta		Neuroterus	
Dates des récoltes	10/7/67	19/9/67	10/7/67	19/9/67	11/5/67	
Stades	Jeunes	Agées	Jeunes	Agées	Jeunes	Bien développées
Ac. aminés et amides						
Asp NH_2 + Glu NH_2	1,84	0,42	7,50	7,50	321,98	394,38
Ser	0,68	0,41	1,09	2,63	4,47	8,22
Glu	2,06	2,24	1,12	2,09	7,74	9,62
Asp	1,61	1,80	1,14	1,75	8,83	7,96
Ala	1,06	0,52	0,82	1,15	11,79	13,13
Arg	0,24	0,00	3,50	2,82	34,66	25,30
Pro	0,38	0,00	0,18	0,65	0,00	0,00
Lys	0,16	0,13	0,25	0,40	3,15	6,16
His	+	0,05	0,13	0,26	3,15	5,66
Gly	0,13	0,11	0,22	0,12	1,45	1,85
Thr	2,65	0,18	0,30	0,50	2,42	3,51
Val	0,19	0,06	0,32	0,42	3,87	5,16
Ile	0,16	0,05	0,15	0,23	2,66	3,65
Leu	0,14	0,05	0,10	0,15	1,21	1,25
Tyr	0,13	0,05	0,08	0,13	1,75	0,80
Phe	0,14	0,07	0,12	0,14	0,78	0,80
Try	0,00	0,00	0,00	0,73	0,97	1,75
Total	11,57	6,14	17,02	21,67	410,88	489,20

Une analyse plus détaillée des résultats fait cependant apparaître des différences très marquées entre la composition des galles et celle des tissus sains. Les principaux points de divergence concernent :

- les compositions en acides organiques,

- les taux d'azote, parfois beaucoup plus faibles dans les galles,
- les teneurs en composés azotés solubles,notamment l'abondance d'asparagine et d'arginine dans les cécidies.

L'étude de l'évolution des acides aminés et amides libres durant la vie des organes met en évidence une autre différence entre les feuilles et les galles : dans les premières, les taux diminuent au cours du vieillissement (tableau XXIV mais aussi tableau II) ; dans les cécidies, au contraire, ils augmentent et les galles âgées sont plus riches que celles nouvellement formées.

Les analogies de composition entre les cécidies et les feuilles jeunes se limitent donc à un nombre restreint de caractéristiques. L'étude détaillée des constituants azotés montre, de plus, que les similitudes mises en évidence ne semblent par être la conséquence d'une identité de métabolisme entre les tissus sains et pathologiques.

VII.- ACIDES AMINES PROTEIQUES

Comme les protéines foliaires, celles des galles ne libèrent, dans les conditions d'hydrolyse retenues, ni cystine, ni méthionine (tableau XXV).

TABLEAU XXV

Acides aminés protéiques. Résultats exprimés en % des acides aminés totaux

Nature des organes	Feuilles	Galles de Cynips	Galles de Dryophanta	Galles de Biorhiza	Galles de Neuroterus
Ac. aminés et amides					
Lys	6,00	6,32	7,66	9,31	5,92
His	2,19	2,98	3,05	4,14	1,95
Arg	4,11	4,33	4,02	6,05	4,03
Asp + Asp NH_2	9,50	13,18	8,29	8,67	10,27
Thr	4,98	4,87	4,74	4,65	5,46
Ser	4,63	4,87	6,88	6,10	6,70
Glu + Glu NH_2	10,61	10,84	10,76	10,39	11,32
Pro	5,84	6,60	7,09	3,52	4,81
Gly	10,79	9,44	11,18	9,76	11,23
Ala	9,33	8,25	8,57	7,79	9,08
Val	8,01	7,99	6,88	7,45	7,49
Ile	5,85	5,50	5,36	5,33	5,32
Leu	10,02	8,91	8,81	9,05	9,12
Tyr	2,99	1,89	2,35	2,83	2,93
Phe	5,09	4,00	4,35	4,94	4,36

Les deux autres aminoacides peu abondants sont la tyrosine et l'histidine. A l'inverse, on note la grande richesse des protéines en leucine, glycocolle et alanine ; celles de Biorhiza se singularisent toutefois par un taux anormalement élevé de lysine et d'arginine. Ce cas excepté, les protéines des galles ne diffèrent, par aucun trait majeur de leur composition en acides aminés, de celles du végétal sain.

G.- ACIDES PHENOLIQUES

Les travaux sur les composés phénoliques des galles concernent essentiellement les substances à plusieurs noyaux benzéniques : tannins (KUSTENMACHER, 1894 ; KIEFFER, 1897 ; MOLLIARD, 1913 ; NEWCOMB, 1951), flavonoïdes et anthocyanes (BLUNDEN et CHALLEN, 1965). Dans ce travail, j'ai plus spécialement cherché à dresser un bilan des acides phénoliques présents dans les galles de Cynips et de Dryophanta (GADAL et al., 1968 a) ; ces formes simples, par leur intervention comme précurseurs ou comme intermédiaires, jouent en effet, un rôle biosynthétique essentiel dans l'élaboration de la plupart des autres substances aromatiques complexes.

I.- FORMES SOLUBLES

De même que dans les feuilles de Chêne (ALIBERT et al., 1969), les acides phénoliques existent dans les galles à l'état de combinaisons ; seul l'acide ellagique se trouve à l'état libre dans les deux cécidies (tableau XXVI).

TABLEAU XXVI

Acides phénoliques libres ou présents sous formes de combinaisons solubles. E_t : extrait non hydrolysé ; E_a : hydrolyse acide ; E_e : hydrolyse enzymatique ; E_b : hydrolyse alcaline

	Galles de : Cynips				Dryophanta			
Acides phénoliques	E_t	E_a	E_e	E_b	E_t	E_a	E_e	E_b
Série cinnamique								
Ac. caféique				+				
Ac. férulique				+				
Série benzoïque								
Ac. salicylique		+		+				
Ac. protocatéchique		+		+		+	+	
Ac. gentisique		+	+			+		
Ac. gallique		+	+	+		+	+	+
Ac. vanillique		+		+				
Ac. syringique		+						
Ac. ellagique	+	+	+	+	+	+	+	+

Les deux galles se différencient nettement par le nombre d'acides phénoliques libérés par les trois types d'hydrolyses (tableau XXVI). La cécidie de Cynips est qualitativement la mieux pourvue. Celle de Dryophanta ne possède aucun terme de la série cinnamique ; en particulier, elle ne renferme pas d'acide p.coumarique pourtant abondant dans les feuilles âgées parasitées par cette galle (ALIBERT et al., 1969). Dans ces cécidies également, les composés de la série benzoïque ne sont que partiellement représentés et on note l'absence des deux composés méthoxylés : les acides vanillique et syringique.

A la différence des résultats obtenus pour les feuilles de Chêne, les hydrolyses acides et alcalines ne libèrent pas, dans tous les cas, les mêmes acides phénoliques. Seuls les acides salicylique, protocatéchique, gallique et vanillique sont présents à la fois sous forme d'hétérosides (sensibles à l'action de l'acide) et d'esters (hydrolysés par la soude) dans les galles de Cynips ; dans celles de Dryophanta, seul l'acide gallique existe sous les deux formes.

Dans les cécidies de Cynips, les acides cinnamiques semblent préférentiellement liés sous forme d'esters. En revanche, la grande majorité des acides benzoïques existe sous forme d'hétérosides. La liaison avec le glucose intéresse les acides gallique et gentisique dans les galles de Cynips et les acides protocatéchique et gallique dans celles de Dryophanta.

Du point de vue métabolique, l'absence d'acides en C_6-C_3 dans les cécidies de Dryophanta pose le problème de l'origine des acides benzoïques dans ces organes. En effet, selon ZENK (1966), ces unités en C_6-C_1 proviendraient d'une β-oxydation des acides cinnamiques correspondants. Cependant, la mise en évidence chez le Chêne (MARIGO, 1970) d'une autre voie de formation à partir de l'acide 3-déshydroshikimique permet, au moins dans le cas des acides gallique et protocatéchique, d'expliquer la présence de ces composés en absence de leurs homologues en C_6-C_3.

II.- TANNINS ET RESIDU INSOLUBLE

Comme en témoigne la libération d'acides phénoliques sous l'action de l'acide chlorhydrique, les deux galles renferment des tannins hydrolysables (tableau XXVII).

TABLEAU XXVII

Acides phénoliques libérés par hydrolyse acide des tannins

	Galles de : Cynips	Dryophanta
Acides phénoliques		
Ac. ellagique	+	+
Ac. gallique	+	+
Ac. protocatéchique	+	
Ac. gentisique	+	

Ceux de la production de Dryophanta semblent les plus simples car ils ne libèrent que les acides gallique et ellagique, unités de base typiques des tannins hydrolysables (RIBEREAU-GAYON, 1968). Les substances tannantes de la cécidie de Cynips, plus complexes, se rapprochent de celles contenues dans les feuilles âgées (ALIBERT, 1968) ; en plus des deux composés précédemment cités, ils renferment, en effet, deux autres acides de la série benzoïque, les acides protocatéchique et gentisique.

Enfin, par la nature des acides phénoliques liés au résidu insoluble (tableau XXVIII), les deux cécidies diffèrent aussi nettement. Dans les galles de Cynips, les acides p.coumarique et ellagique sont libérés par l'action de la soude, tandis que les acides vanillique et syringique sembleraient liés sous forme d'hétérosides. Dans les cécidies de Dryophanta, seuls restent fixés au résidu insoluble les acides gallique et ellagique.

TABLEAU XXVIII

Acides phénoliques liés au résidu insoluble d'extraction. R_a : hydrolyse acide - R_b : hydrolyse alcaline

	Galles de : Cynips		Dryophanta	
Acides phénoliques	R_a	R_b	R_a	R_b
Ac. p.coumarique		+		
Ac. gallique			+	
Ac. vanillique	+			
Ac. syringique	+			
Ac. ellagique		+		+

En conclusion, dans les galles comme dans les différents organes du Chêne, les acides de la série benzoïque prédominent largement sur leurs homologues de la série cinnamique. Rarement présents à l'état libre (sauf l'acide ellagique), ils existent dans les tissus gallaires sous formes d'esters, d'hétérosides, de tannins et peuvent se lier aux polymères insolubles.

La cécidie formée dans les bourgeons par Cynips possède un contenu phénolique beaucoup plus diversifié que la galle foliaire de Dryophanta. De plus, comme cette dernière est moins bien pourvue que les organes qu'elle parasite, on peut en déduire que ces substances aromatiques ne migrent pas des feuilles vers les galles.

Enfin, si la caractéristique essentielle de nombreuses galles induites par les Cynipides sur le Chêne est l'accumulation dans les tissus gallaires de composés phénoliques, les résultats obtenus ici montrent que cette propriété n'est pas générale ; les tissus gallaires peuvent même être qualitativement moins riches que ceux du végétal sain.

H.- CONCLUSIONS

Les néoformations induites sur le Chêne par l'action des Cynipides gallicoles appartenant aux genres Neuroterus, Biorhiza, Cynips et Dryophanta possèdent en commun les caractéristiques suivantes que les différencient des organes de la plante saine :

- elles présentent un degré d'hydratation plus élevé,
- renferment par unité de masse sèche plus de constituants solubles,
- contiennent un taux supérieur de glucides solubles (glucose et fructose essentiellement),
- et se signalent, enfin, par l'importance des composés azotés solubles dans le pool azoté total.

Ces similitudes portent sur des aspects globaux de leur composition. Dans le détail, les galles présentent entre elles de nombreuses différences. Par suite de la physiologie très comparable des plantes attaquées, il semblait logique d'attribuer ces divergences à la spécificité d'action de chaque parasite.

En fait, les résultats obtenus mettent surtout en évidence une grande identité de composition des galles formées à la même époque, et ceci indépendamment de la nature de l'agent cécidogène ou de celle de l'organe attaqué, feuille ou bourgeon.

Les galles printanières de Neuroterus et de Biorhiza se caractérisent par leur richesse en eau, par la prépondérance de l'acide malique sur l'acide quinique et par leurs fortes teneurs en composés azotés totaux et solubles ; au contraire, les galles développées à une époque plus avancée de la période végétative (cécidies de Cynips et de Dryophanta) contiennent plus d'acide quinique que d'acide malique et renferment des taux très faibles d'azote total et soluble.

Cette relation ne s'applique cependant pas à tous les constituants et on note, par exemple, des taux dissemblables d'acides phénoliques dans les galles de Cynips et de Dryophanta pourtant apparues à la même époque. La première a une contenu phénolique relativement riche et varié alors que la seconde, plus pauvre, ne renferme que certains termes de la série benzoïque.

Une étude plus approfondie des constituants azotés a permis de démontrer que les valeurs élevées du rapport $\frac{\text{N soluble}}{\text{N total}}$ sont dues aux fortes teneurs en composés aminés libres parmi lesquels les amides, les acides aspartique et glutamique, la sérine, l'alanine et l'arginine occupent toujours une place prépondérante. L'accumulation d'asparagine et, à un degré moindre, celle d'arginine sont typiques des galles présentant des taux très élevés en composés azotés solubles.

Inégalement répartis dans les tissus cécidiens, ces composés azotés proviennent d'une migration à partir de la plante-hôte ; l'ensemble du végétal, et non seulement l'organe parasité, participe vraisemblablement à la nutrition de la galle. Cette déduction suggère aussi que la similitude de composition des organes selon leur époque de récolte provient, pour une grande part, de l'état physiologique de l'arbre. Il est en effet probable qu'à la reprise de la végétation, la mobilisation des réserves contenues dans les organes vivaces, libère des substances azotées solubles qui migrent, en quantités importantes, vers les galles printanières. Au contraire, durant l'été, la réduction dans des proportions notables des métabolites facilement

utilisables constitue un facteur défavorable pour les galles induites à cette époque. Elle contribue sans doute au maintien du taux d'azote total de ces formations pathologiques à un niveau très bas.

Il semble donc que la composition des galles dépende non seulement de la spécificité d'action de chaque agent pathogène, mais aussi, dans une large mesure, de l'état physiologique du végétal. Toutefois, cette conclusion se base sur l'examen d'un nombre très restreint de cécidies ; afin d'en vérifier la généralité, de nouvelles études, sur des galles induites par d'autres insectes sur de nombreuses espèces végétales, seront donc nécessaires.

Enfin, malgré la dépendance nutritionnelle des galles vis-à-vis de leur plante-hôte, les différences très nettes de composition entre les cécidies et les organes de référence suggèrent l'existence, chez ces formations pathologiques, de potentialités métaboliques actives. Le chapitre suivant sera consacré à la vérification de cette hypothèse.

CHAPITRE III

ETUDE DE QUELQUES ASPECTS DU METABOLISME DU CHENE ET DES GALLES

A.- DEVENIR DU GLUCOSE $U^{14}C$

I.- BIOSYNTHESE DES ACIDES ORGANIQUES

II.- BIOSYNTHESE DES ACIDES AMINES ET AMIDES

B.- SYNTHESE PROTEIQUE

C.- CONCLUSIONS

CHAPITRE III

ETUDE DE QUELQUES ASPECTS DU METABOLISME DU CHENE ET DES GALLES

Les voies métaboliques conduisant à l'élaboration des unités simples (glucides, acides aminés, nucléotides,...) dont la condensation aboutit aux macromolécules constitutives de tout organisme vivant n'ont, à ma connaissance, jamais été recherchées dans les galles d'insectes. En effet, la méthode de choix dans la détermination des séquences métaboliques : l'utilisation des isotopes, n'a fait l'objet d'aucune application chez ces formations pathologiques. Par ailleurs, les études enzymatiques ne fournissent dans ce domaine aucun renseignement ; souvent anciennes, elles se consacrent presque exclusivement à la caractérisation des biocatalyseurs directement impliqués dans la nutrition de l'insecte : amylase (KOSTOFF et KENDALL, 1929), protéases (BECK, 1946), aminopeptidases (BRONNER, 1969).

Cette absence de données ne permet donc pas à l'heure actuelle de connaître dans quelle mesure les cécidies peuvent réaliser par elles-mêmes la synthèse de leurs constituants primordiaux ; ou si, par suite d'un équipement enzymatique réduit, elles doivent se les procurer entièrement à partir de la plante-hôte.

Afin d'obtenir quelques informations sur les potentialités métaboliques des galles du Chêne, j'ai donc suivi dans les cécidies de Biorhiza, de Neuroterus et dans des rameaux feuillés de Chêne pris comme témoins, quelques étapes du devenir du glucose $U^{14}C$. J'ai retenu ce glucide en raison de sa situation privilégiée dans le métabolisme : les produits de son catabolisme constituent le point de départ de très nombreuses chaînes biosynthétiques. Dans ce chapitre, j'ai également examiné l'incorporation dans les protéines de deux acides aminés formés à partir de ce précurseur : l'acide glutamique et la phénylalanine.

A.- DEVENIR DU GLUCOSE $U^{14}C$

Les quantités de glucose $U^{14}C$ (activité spécifique 25-50 mCi/mM) réellement absorbées et les caractéristiques du matériel végétal utilisé dans cette expérience sont réunies dans le tableau XXIX.

Des quantités voisines de précurseur radioactif ont été fournies à des masses très dissemblables de matériel végétal (tableau XXIX). Ce fait, joint à l'existence de pools très différents d'acides aminés ou d'acides organiques dans les galles et dans les feuilles de Chêne (tableaux XIV, XV et XVIII) ne permet d'effectuer

des comparaisons quantitatives entre les différents organes qu'avec une grande prudence. Ces remarques sont également valables pour l'interprétation des résultats reportés dans les tableaux XXXIII et XXXVI.

TABLEAU XXIX

Radioactivités absorbées (en µCi) et caractéristiques du matériel végétal lors de l'incorporation de glucose $U^{14}C$ à des galles et à des rameaux de Chêne

Nature des organes	Nombre	Durées de métabolisation en heures	µCi absorbées	Masses des échantillons en mg	
				Mat. frais	Mat. sec
Rameaux de Chêne	1	4	3,83	1 373	417
	1	10	3,87	1 426	453
	1	23	3,87	2 165	605
Galles de Biorhiza	2	4	3,09	4 570	782
	2	10	3,08	4 800	737
	2	23	3,09	6 380	1 085
Galles de Neuroterus	8	4	3,10	1 864	106
	8	10	3,10	1 644	105
	8	23	3,10	2 822	146

I.- BIOSYNTHESE DES ACIDES ORGANIQUES

a.- Activités totales

A partir de la chaîne carbonée du glucose, les galles comme les rameaux de Chêne, peuvent synthétiser tous les acides organiques détectables par la méthode retenue. L'acide malique (tableau XXX) constitue dans tous les cas le composé le plus fortement radioactif et même, pour les temps de métabolisation de 10 et 23 heures (non figurés sur ce tableau), son marquage demeure nettement plus élevé que celui de l'acide quinique dont les teneurs sont pourtant supérieures (rameaux) ou très comparables (galles de Neuroterus).

Ce résultat est en accord avec les données de MAROC-GYR (1965), de MAROC (1967) et de TAVANT (1967) qui ont également constaté qu'après incorporation de glucose marqué à des feuilles de Pelargonium et de Begonia, l'acide malique constitue le composé le plus radioactif de la fraction anionique.

Dans les galles, une fraction plus importante de la radioactivité totale s'incorpore dans l'acide citrique que dans l'acide quinique, tandis que la situation inverse se présente dans les tiges feuillées.

Malgré leur peu d'importance à l'état libre, il faut noter le marquage assez élevé des acides glycérique et glycolique. Mais, dans l'optique de ce travail, il convient surtout de signaler la formation, dans les galles de Neuroterus, d'acide

shikimique, cet acide alicyclique jouant un rôle essentiel dans l'élaboration des acides aminés aromatiques.

TABLEAU XXX

Acides organiques formés dans les rameaux de Chêne et les galles après incorporation de glucose U^{14}C. Durée de métabolisation 4 heures. Radioactivités totales exprimées en dpm/g mat. sec. Radioactivités spécifiques en dpm/µM

Nature des organes	Rameaux de Chêne		Galles de : Biorhiza		Galles de : Neuroterus	
Radioactivités	Totales	Spécifiques	Totales	Spécifiques	Totales	Spécifiques
Acides organiques						
Ac. shikimique	1 866	261	ND		71 469	17 305
Ac. quinique	7 118	37	19 766	892	8 598	74
Ac. glycérique + Ac. glycolique	6 639	ND*	15 929	ND	ND	
Ac. malique	42 200	1 934	142 088	654	104 763	820
Ac. citrique	822	1 028	54 566	1 850	14 023	2 482

* ND : Radioactivité non déterminée.

Les galles possèdent donc l'équipement enzymatique nécessaire à la métabolisation du glucose, et les premiers résultats obtenus sont en faveur d'une dégradation par la voie d'EMBDEN-MEYERHOF ; l'acide pyruvique formé est, après décarboxylation, utilisé dans le cycle de KREBS pour former en particulier les acides citrique et malique. Il est aussi probable que la voie des pentoses existe dans les cécidies ; la synthèse de l'acide 5-déshydroquinique, précurseur commun des acides quinique et shikimique (DAVIS, 1955, voir schéma 1 page 97) nécessitant de l'érythrose-4-phosphate en plus du phosphoénolpyruvate (PEP) fourni par la glycolyse.

b.- Activités spécifiques

L'étude cinétique de l'évolution de la radioactivité spécifique des acides malique et citrique dans les rameaux (figure 18 a) montre que l'acide malique présente, pour des temps courts, des activités supérieures à celles de l'acide citrique. Cette constatation ne s'accorde pas avec l'intervention unique du cycle de KREBS dans la biogénèse des deux acides ; en effet, l'acide tricarboxylique provenant directement de la condensation d'une unité acétate avec l'acide oxalacétique devrait toujours présenter une activité spécifique supérieure à celle de l'acide malique. Ce dernier composé doit donc se former au moins partiellement par un autre mécanisme. Une carboxylation directe du PEP paraît l'hypothèse la plus plausible ; car, en plus de l'activité élevée de cet intermédiaire, elle permet également l'intégration, dans l'acide malique, du CO_2 radioactif issu de la dégradation du glucose.

Les résultats obtenus dans le cas des galles de Biorhiza (figure 18 b) et de Neuroterus* (tableau XXX) sont en accord avec l'intervention prépondérante du cycle de KREBS ; les activités spécifiques de l'acide citrique sont toujours nettement supérieures à celles de l'acide malique.

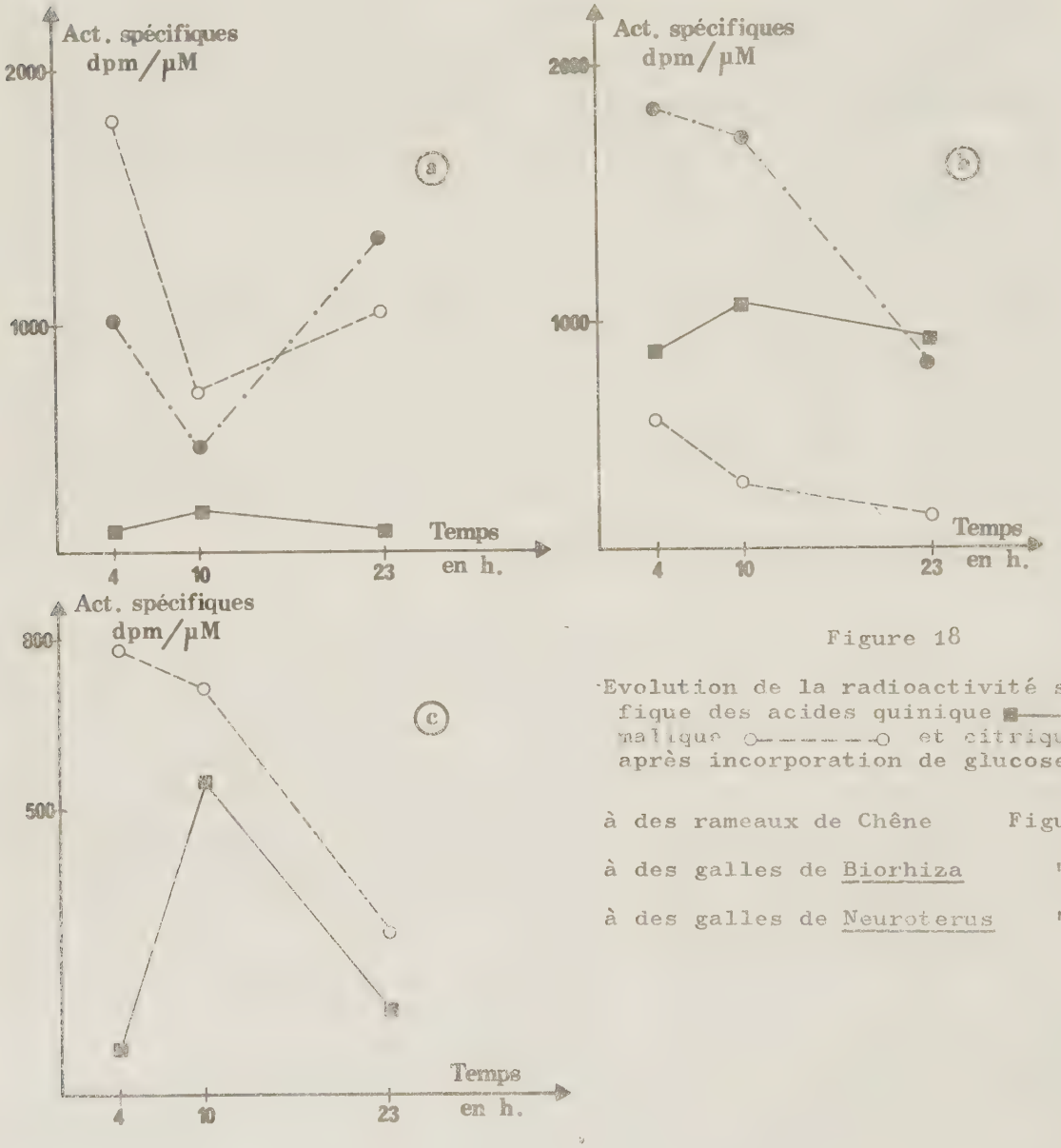


Figure 18

Evolution de la radioactivité spécifique des acides quinique ■——■, malique ○- - - - -○ et citrique ●-·-·-● après incorporation de glucose U ^{14}C

à des rameaux de Chêne Figure 18 a

à des galles de Biorhiza " 18 b

à des galles de Neuroterus " 18 c

* Le cas des galles de Neuroterus n'a pu être examiné pour toutes les durées de métabolisation, car elles renferment souvent de trop faibles quantités d'acide citrique pour permettre des dosages précis à partir des quantités de matériel végétal utilisées.

Le cas de cet acide organique mérite d'ailleurs un examen plus approfondi. Malgré son abondance, il n'accumule pas la radioactivité en provenance du glucose et ne constitue, même en partie, dans les conditions expérimentales retenues, un des termes finaux du métabolisme de cet hexose. En outre, la diminution très nette de sa radioactivité spécifique montre (figure 18 b et c) qu'il est renouvelé rapidement et qu'il participe donc activement au métabolisme cellulaire. Néanmoins, en raison de l'importance quantitative de son pool (entre 10 et 20 fois supérieur à celui de l'acide citrique) il est difficile de concevoir que la totalité de l'acide malique contenu dans la cellule soit uniformément métabolisée. Dans ce cas, pour expliquer les diminutions comparables des activités spécifiques des deux intermédiaires du cycle de KREBS (figure 18 b) il faudrait admettre que l'acide malique se renouvelle 10 à 20 fois plus rapidement que l'acide citrique. Ceci paraît improbable et il est plus satisfaisant d'envisager, comme dans le cas des racines de Maïs (LIPS et BEEVERS, 1966), que seule une fraction active du pool, contenue sans doute dans les mitochondries (OAKS et BIDWELL, 1970), participerait au cycle de KREBS ; l'autre fraction, la plus importante quantitativement, serait stockée dans la vacuole et de ce fait soustraite à l'action de la malate déshydrogénase.

Enfin, dans tous les organes, l'acide quinique présente son activité spécifique maximale au bout de 10 heures. Il est donc synthétisé moins rapidement que les acides du cycle tricarboxylique ; l'intervention des deux mécanismes de dégradation du glucose (glycolyse, voie des pentoses) procédant à des vitesses différentes pourrait être en partie responsable de la lenteur relative de formation de ce composé.

II.- BIOSYNTHESE DES ACIDES AMINES ET AMIDES

a.- Activités totales

Comme le laissaient prévoir les résultats obtenus dans l'étude des acides organiques, les galles comme les rameaux de Chêne peuvent, à partir du squelette carboné du glucose, synthétiser tous les acides aminés étudiés (tableau XXXI).

Après 4 heures de métabolisation, les acides glutamique et aspartique sont les composés nettement les plus marqués des rameaux de Chêne et des galles de Biorhiza. Dans les cécidies de Neuroterus, leurs radioactivités totales sont inférieures ou seulement comparables à celles de l'asparagine, de la glutamine, de l'alanine, de la valine et de l'isoleucine. Dans ces galles, il faut aussi noter le marquage important de la leucine et de l'isoleucine alors que ces acides aminés ramifiés montrent une radioactivité très réduite dans les autres organes.

La biosynthèse active de l'acide glutamique (ce composé est toujours formé en plus grande quantité que l'acide aspartique) est particulièrement intéressante. Elle rend probable en effet, l'existence dans les galles d'une amination réductrice de l'acide α-cétoglutarique et permet dès lors de penser que grâce à l'intervention des transaminases de l'acide glutamique (chapitre III, deuxième partie), les groupements $-NH_2$ des acides aminés peuvent provenir en totalité de l'azote minéral.

Sous l'influence de deux synthétases (FOWDEN, 1965) les acides glutamique et aspartique peuvent également fixer l'ammoniaque pour former les amides correspondantes. Ces deux enzymes paraissent fonctionnelles dans les galles avec

toutefois une nette dominance de la glutamine synthétase. En effet, malgré des teneurs beaucoup plus faibles, la glutamine présente un marquage nettement supérieur à celui de l'asparagine.

TABLEAU XXXI

Acides aminés et amides formés dans les rameaux de Chêne et les galles après incorporation de glucose $U^{14}C$. Durée de métabolisation 4 heures. Radioactivités totales exprimées en dpm/g mat. sec. Radioactivités spécifiques en dpm/µM

Nature des organes	Rameaux de Chêne		Galles de : Biorhiza		Galles de : Neuroterus	
Radioactivités	Totales	Spécifiques	Totales	Spécifiques	Totales	Spécifiques
Ac. aminés et amides (1)						
Asp NH_2	4 513	145	14 228	69	22 661	53
Glu NH_2	7 650	2 400	19 100	711	31 533	3 365
Ser	2 600	821	33 731	2 778	8 683	493
Glu	31 671	11 761	74 363	6 016	21 707	5 278
Asp	11 245	4 083	73 719	4 057	10 511	605
Ala	2 983	4 062	30 662	19 910	25 363	2 094
Pro	1 147	1 470	5 275	ND	3 199	ND
Gly	765	25 000	3 312	4 088	8 911	2 788
Thr	1 989	3 823	2 800	906	5 454	1 090
Val	1 224	3 200	3 100	1 360	10 739	1 631
Ile	+		+		15 766	5 000
Leu	+		+		9 825	7 962
Tyr	+		3 342	3 038	+	
Phe	918	1 935	15 431	6 376	2 513	2 391

(1) La biosynthèse des acides aminés basiques : lysine, histidine et arginine n'a pas été envisagée dans cette étude. Elle fera l'objet d'un travail ultérieur.

En ce qui concerne les acides aminés aromatiques, la phénylalanine est, dans tous les cas, formée en plus grande quantité que la tyrosine. Le marquage de ces deux composés peut résulter simplement de la fixation du PEP sur l'un des intermédiaires de la voie de l'acide shikimique (YOSHIDA, 1969) ; mais, par suite de la formation dans les galles des acides quinique et shikimique, leur synthèse complète à partir du glucose est également possible. Cette hypothèse sera examinée en détail au chapitre suivant.

b.- Activités spécifiques

Dans les rameaux de Chêne et les galles de Biorhiza, les valeurs des activités spécifiques des acides aminés et amides (tableau XXXI et figure 19) sont

conformes aux filiations maintenant bien établies entre ces divers métabolites (FOWDEN, 1965). En effet, l'acide glutamique précurseur de la glutamine et de la proline présente un marquage plus intense que ses dérivés. Cette même constatation s'applique à l'acide aspartique et aux composés auxquels il donne naissance : asparagine, thréonine, isoleucine. Pour les aminoacides ayant pour origine l'acide pyruvique : valine et leucine, il n'existe qu'une preuve indirecte basée sur la forte activité de l'alanine, car on peut admettre que l'activité spécifique de l'acide pyruvique est au moins égale à celle de l'acide aminé qu'il produit.

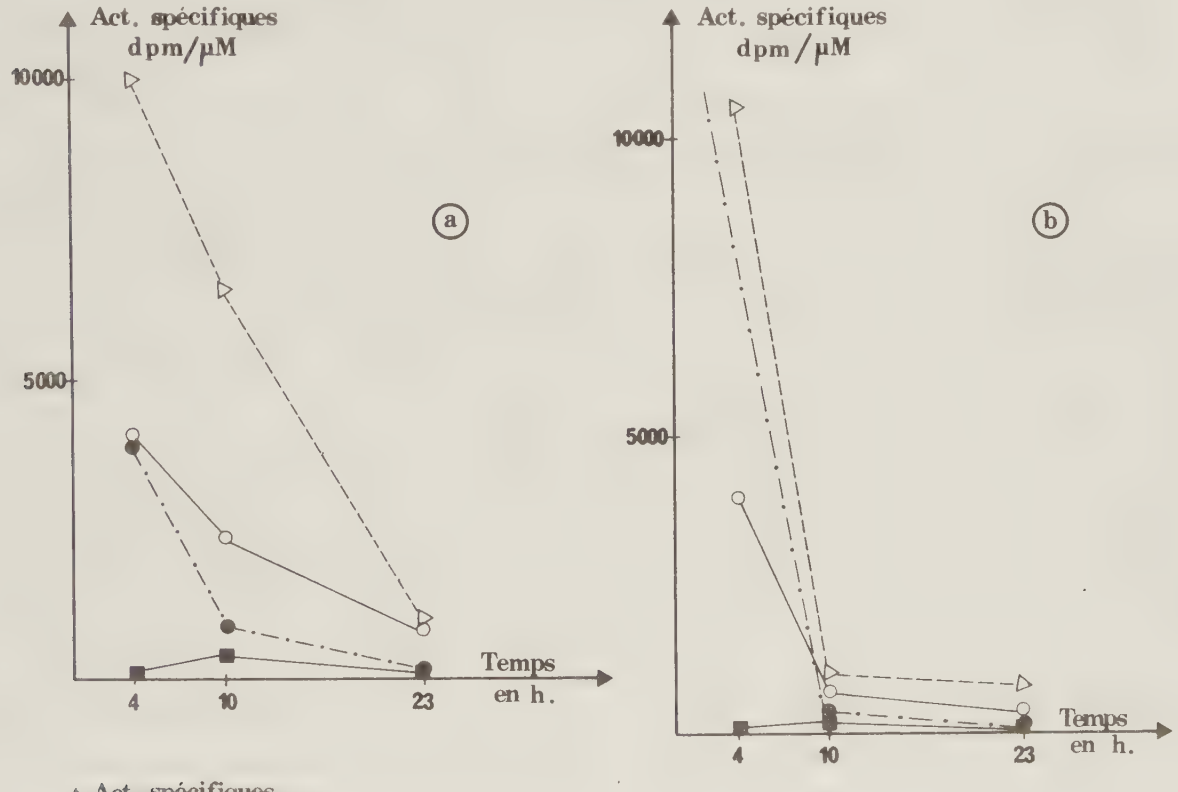


Figure 19

Evolution de la radioactivité spécifique de l'acide glutamique Δ-----Δ de l'acide aspartique ○———○, de l'alanine ●-·-·-·-● et de l'asparagine ■——■ .

après incorporation de glucose U ^{14}C

à des rameaux de Chêne figure 19 a

à des galles de Biorhiza " 19 b

à des galles de Neuroterus " 19 c

Les galles de Neuroterus ont, à nouveau, un comportement original et on constate que la gradation normale des activités spécifiques correspondant à la succession des séquences métaboliques n'est pas toujours respectée ; le produit final peut même présenter un marquage plus intense que son précurseur (acide aspartique

et isoleucine). Ce résultat est sans doute dû à une dégradation rapide du glucose ce qui entraîne une synthèse accélérée des premiers précurseurs aminés : ceux-ci présenteraient dès lors, leur marquage maximum après une durée de métabolisation beaucoup plus courte que la période de 4 heures retenue ici.

L'étude des variations des activités spécifiques, en fonction du temps, permet de constater (figure 19) que les acides aminés, élaborés à partir du glucose, ne sont pas mis en réserve mais sont, au contraire, rapidement réutilisés dans le métabolisme. De fait, ils présentent leur radioactivité la plus élevée pour une durée de métabolisation de 4 heures. L'intensité de leur marquage s'atténue ensuite ; certains composés ne possèdent plus au bout de 23 heures qu'une radioactivité à peine décelable.

L'asparagine fait toutefois exception à cette règle générale : dans tous les cas, son activité spécifique n'est maximale qu'au bout de 10 heures. En plus de son comportement cinétique original, cette amide se distingue par le niveau très bas de son activité spécifique qui demeure, en particulier, beaucoup plus faible que celle de l'acide aspartique. Ce résultat montre que lors de l'extraction, l'asparagine néoformée est très diluée par l'amide inerte préexistante ; seule, une fraction du pool total serait marquée à partir du glucose. Comme dans le cas de l'acide malique, on est également amené à concevoir l'existence de pools actifs et inactifs, localisés dans des organites distincts de la cellule.

Contrairement aux résultats escomptés, la métabolisation du glucose ne conduit donc à une synthèse massive d'asparagine, ni dans les galles de Biorhiza, ni dans celles de Neuroterus. Au premier abord, ce résultat peut être attribué à l'existence dans les tissus gallaires d'activités enzymatiques réduites. Pourtant, compte tenu du rôle essentiel de l'asparagine dans la mise en réserve de l'excédent d'azote présent dans les cellules (STEWARD et DURZAN, 1965), il est vraisemblable que cette genèse limitée est due à l'absence, dans les cécidies détachées de leur support, de quantités excessives de sels ammoniacaux et d'acides aminés libres. Au contraire, dans les galles encore en relation avec leur hôte, l'arrivée régulière de substances azotées fournit les substrats nécessaires à sa formation et permet ainsi une synthèse massive d'asparagine.

B.- SYNTHESE PROTEIQUE

Pour mettre en évidence la synthèse protéique, j'ai fourni à des galles et à des rameaux de Chêne de la l-phénylalanine $U^{14}C$ (activité spécifique 187 mCi/mM) et de l'acide l-glutamique $U^{14}C$ (activité spécifique 106,5 mCi/mM). Les durées de métabolisation, les quantités de radioéléments réellement absorbées et les caractéristiques du matériel végétal sont indiquées dans le tableau XXXII.

TABLEAU XXXII

Radioactivités absorbées (en µCi) et caractéristiques du matériel végétal lors de l'incorporation de phénylalanine $U^{14}C$ et d'acide glutamique $U^{14}C$ à des galles et à des rameaux de Chêne

Nature des organes	Nombre	Durées de métabolisation en heures	µCi absorbées	Masses des échantillons en mg	
				Mat. frais	Mat. sec
Incorporation de phénylalanine					
Rameaux de Chêne	1	4	3,80	1 215	487
	1	10	3,90	1 371	367
	1	23	3,90	1 914	490
G. Biorhiza	2	4	3,08	2 950	459
	2	10	3,05	2 700	440
	2	23	3,15	3 560	603
G. Neuroterus	8	4	3,16	1 973	109
	8	10	3,16	1 473	93
	8	23	3,16	1 045	62
Incorporation d'ac. glutamique					
Rameaux de Chêne	1	10	5,00	2 600	659
G. Biorhiza	2	10	1,90	11 050	1 777
G. Neuroterus	8	10	1,40	1 949	122

Les galles peuvent incorporer dans leurs protéines la phénylalanine et l'acide glutamique (tableau XXXIII). Dans les cécidies de Biorhiza, la phénylalanine protéique présente son activité spécifique maximale au plus tard 4 heures après le début de l'absorption. Dans les rameaux, le maximum d'activité n'est atteint qu'après 10 heures de métabolisation, tandis que dans les galles de Neuroterus, il n'apparaît ni augmentation ni diminution nettes des radioactivités spécifiques.

TABLEAU XXXIII

Incorporation de la phénylalanine et de l'acide glutamique dans les protéines du Chêne, des galles de Biorhiza et de Neuroterus. Radioactivités totales exprimées en dpm x 10^{-3}/g mat. sec. Radioactivités spécifiques en dpm/µM

Nature des organes		Rameaux de Chêne		Galles de : Biorhiza		Galles de : Neuroterus	
Radioactivités		Totales	Spécifiques	Totales	Spécifiques	Totales	Spécifiques
Acides aminés	Durées en h						
Phe	4	264	7,8	4 418	122	2 937	204
	10	730	15,0	4 713	109	2 781	185
	23	478	11,0	3 854	70	3 833	209
Glu	10	322	4,0	142	1,0	150	2,5

L'expression des résultats en pourcentages de la radioactivité absorbée (tableau XXXIV) fait apparaître que les proportions d'acide glutamique incorporées dans les macromolécules protéiques sont nettement plus faibles que celles de phénylalanine. Or, l'exmaen de la constitution des protéines (tableau XXV) montre qu'elles renferment vraisemblablement ces deux aminoacides en quantités comparables.

TABLEAU XXXIV

Pourcentages de la radioactivité de la phénylalanine U^{14}C et de l'acide glutamique U^{14}C incorporés dans les protéines. Durée de métabolisation 10 heures

Nature des organes	Rameaux de Chêne	Galles de : Biorhiza	Galles de : Neuroterus
Phe	3,1	31,1	3,8
Glu	1,9	3,6	0,6

Il est donc probable, par suite de son implication dans de nombreuses réactions du métabolisme azoté et carboné, que l'acide glutamique absorbé n'est qu'en partie soumis à l'action des enzymes d'activation ; la phénylalanine au contraire, engagée dans un nombre restreint de séquences métaboliques est disponible en plus grandes quantités pour la synthèse protéique.

C.- CONCLUSIONS

L'incorporation de glucose $U^{14}C$ à des galles de Biorhiza et de Neuroterus a permis de démontrer pour la première fois l'existence de nombreuses voies métaboliques chez ces formations pathologiques. A partir de ce précurseur, elles peuvent en effet synthétiser leurs acides organiques, leurs acides aminés et leurs amides. La dégradation de l'hexose procède sans doute par les voies d'EMBDEN-MEYERHOF et des pentoses, les intermédiaires formés étant ensuite impliqués dans des réactions anaboliques qualitativement très proches de celles existant dans le végétal sain. Le fonctionnement du cycle de KREBS conduit à un marquage surtout important de l'acide malique. Il fournit aussi les acides cétoniques indispensables à la genèse des acides aminés et amides. Parmi ces composés aminés, les acides glutamique et aspartique sont toujours fortement radioactifs. Leur utilisation ultérieure permet la synthèse de la proline et de la glutamine d'une part, de la thréonine, de l'isoleucine et de l'asparagine d'autre part. Malgré son importance quantitative dans la constitution azotée des cécidies, cette amide se révèle peu marquée. Ceci met en évidence une synthèse réduite qui peut être attribuée, dans les conditions expérimentales retenues, à un déficit en sels ammoniacaux ou en composés pouvant transférer facilement leur groupement aminé.

L'incorporation de la phénylalanine et de l'acide glutamique dans les protéines montre que les acides aminés peuvent être utilisés par les cécidies pour la construction de leurs macromolécules peptidiques.

Enfin, à partir du glucose, le végétal sain et les galles élaborent, partiellement ou en totalité, les acides aminés aromatiques : tyrosine et phénylalanine. La deuxième partie de ce travail sera consacrée essentiellement à l'étude de quelques-unes des enzymes impliquées dans cette séquence métabolique particulièrement complexe.

DEUXIEME PARTIE

BIOSYNTHESE DE LA TYROSINE ET DE LA PHENYLALANINE CHEZ LE CHENE ET SES GALLES. MECANISMES DE REGULATION

INTRODUCTION

CHAPITRE I

MISE EN EVIDENCE DE LA VOIE DE L'ACIDE SHIKIMIQUE DANS LES GALLES DU CHENE

CHAPITRE II

LA CHORISMATE-MUTASE

CHAPITRE III

LA TRANSAMINASE DES ACIDES AMINES AROMATIQUES

INTRODUCTION

La découverte de la voie métabolique conduisant du glucose aux acides aminés aromatiques est due aux travaux de DAVIS (1955) sur Escherichia coli et Aerobacter aerogenes. A l'aide de mutants polyauxotrophes, cet auteur montra que, chez ces microorganismes, l'acide shikimique est un intermédiaire de cette voie et qu'il constitue un précurseur commun des acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine, tryptophane) et des acides p.aminobenzoïque et p.hydroxybenzoïque. En faisant appel à des mutants, aux techniques isotopiques et aux études enzymatiques, de nombreux auteurs (cf. les revues de DAVIS, 1955 ; SPRINSON, 1960 ; LINGENS, 1968 ; GIBSON et PITTARD, 1968) ont identifié les intermédiaires précédant d'une part, la formation de l'acide shikimique et intervenant, d'autre part, dans la transformation de cet acide alicyclique en composés phénoliques. Cette séquence métabolique, appelée voie de l'acide shikimique, est actuellement bien connue chez les microorganismes (bactéries et levures) ; quelques-unes de ses étapes sont indiquées sur le schéma 1, page 97.

Chez les végétaux supérieurs, l'acide shikimique est largement répandu. Son intervention dans la biosynthèse des acides aminés aromatiques fut mise en évidence par Mc CALLA et NEISH (1959). Puis, GAMBORG et NEISH (1959) constatèrent que cet acide alicyclique constitue chez la Sauge, le Blé et le Sarrazin un excellent précurseur de la tyrosine et de la phénylalanine. Enfin, différentes études, résumées dans une revue récente (YOSHIDA, 1969), généralisèrent ces résultats préliminaires et montrèrent l'existence chez les végétaux supérieurs d'une voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques identique à celle découverte par DAVIS.

Le travail initial de YOSHIDA et TOWERS (1963) montre, chez Pinus resinosa, la formation de l'acide shikimique à partir de l'érythrose-phosphate et du phosphoénolpyruvate; il constitue le point de départ d'un grand nombre d'études enzymatiques axées sur la biosynthèse de cet acide alicyclique. Elles permirent de caractériser chez les végétaux supérieurs la DAHP synthétase (MINAMIKAWA et URITANI, 1967), la déshydroquinate hydrolyase (BALINSKY et DAVIES, 1961 b), et la shikimate-NADP-oxydoréductase (BALINSKY et DAVIES, 1961 a), enzymes essentielles à cette biosynthèse.

Une méthode de séparation des acides alicycliques par électrophorèse a été mise au point au laboratoire. Elle m'a permis, en collaboration avec BOUDET, ALIBERT et MARIGO, de compléter ces études enzymatiques par l'identification, dans les feuilles de Chêne, de deux intermédiaires particulièrement instables de cette séquence métabolique : les acides 5-déshydroquinique et 5-déshydroshikimique (BOUDET et al., 1967).

Par rapport à sa biosynthèse, la transformation de l'acide shikimique en tyrosine et en phénylalanine est moins bien connue. En effet, le plus grand nombre d'études envisagent l'incorporation globale de la radioactivité de ce précurseur

marqué dans les acides aminés aromatiques et n'approfondissent que rarement les différentes étapes de cette transformation. Ainsi, la séquence métabolique conduisant de l'acide shikimique à l'acide chorismique est encore totalement inconnue et les seuls intermédiaires identifiés chez les végétaux supérieurs sont les acides cétoniques aromatiques (KRETOVITCH et GEIKO, 1964 ; BRIENS, 1967).

Dans cette deuxième partie, j'ai d'abord démontré l'existence de la voie de l'acide shikimique dans les galles. J'ai ensuite étudié les différentes étapes de la conversion de l'acide chorismique en tyrosine et en phénylalanine. Dans ce domaine, les recherches les plus complètes ont été effectuées sur le Chêne. Les études sur les galles, essentiellement qualitatives, concernent la mise en évidence des activités enzymatiques et l'examen des propriétés les plus caractéristiques des enzymes identifiées chez le Chêne.

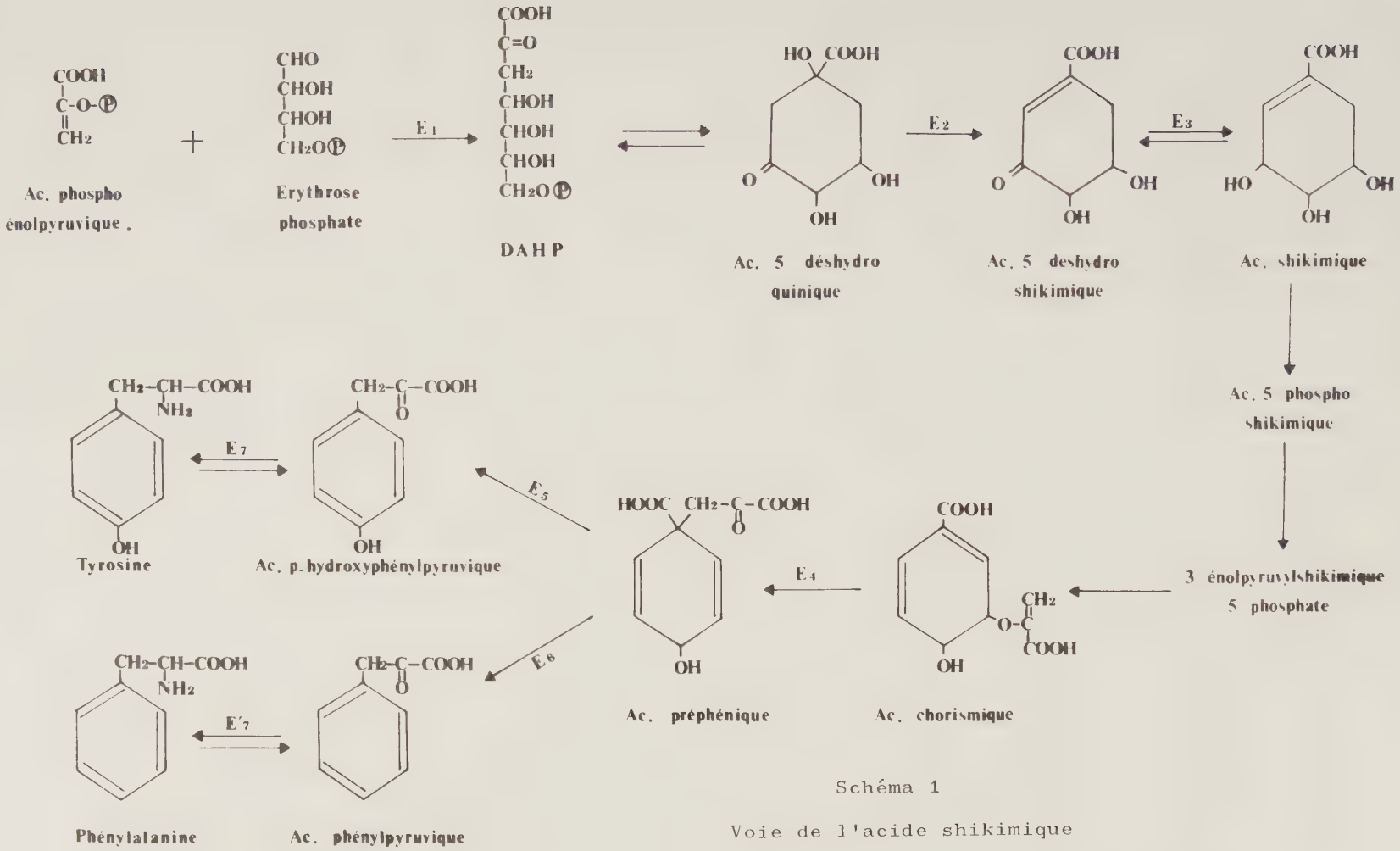


Schéma 1

Voie de l'acide shikimique

E_1 : DAHP synthétase

E_2 : Déshydroquinate hydrolyase

E_3 : Shikimate NADP oxydoréductase

E_4 : Chorismate-mutase

E_5 : Préphénate déshydrogénase

E_6 : Préphénate déshydratase

E_7 : Transaminase des acides aminés aromatiques

CHAPITRE I

MISE EN EVIDENCE DE LA VOIE DE L'ACIDE SHIKIMIQUE DANS LES GALLES DU CHENE

A.- INCORPORATION DE LA RADIOACTIVITE DE L'ACIDE SHIKIMIQUE DANS LES ACIDES AMINES

B.- COMPARAISON DES ACTIVITES SPECIFIQUES

C.- CONCLUSIONS

CHAPITRE I

MISE EN EVIDENCE DE LA VOIE DE L'ACIDE SHIKIMIQUE DANS LES GALLES DU CHENE

A.- INCORPORATION DE LA RADIOACTIVITE DE L'ACIDE SHIKIMIQUE DANS LES ACIDES AMINES

L'intervention de l'acide shikimique dans la biosynthèse de la tyrosine et de la phénylalanine chez le genre Quercus a été récemment démontrée au laboratoire (BOUDET, 1969). Malgré l'importance primordiale qu'ils présentent pour l'insecte, notamment lors de la mue imaginale (élaboration de la cuticule, formation des mélanines,...), le mode de formation de ces acides aminés dans les galles demeure encore pratiquement inconnu. Les résultats exposés au chapitre précédent constituent les premiers renseignements obtenus sur cette biosynthèse. Ils suggèrent néanmoins que l'élaboration de la tyrosine et de la phénylalanine à partir du glucose radioactif s'effectue par l'intermédiaire de la voie métabolique décrite par DAVIS. Dans le but de vérifier cette hypothèse, j'ai donc fourni à des galles de Biorhiza pallida et de Neuroterus quercusbaccarum et, à titre de comparaison, à des rameaux de Chêne, de l'acide shikimique ^{14}C (activité spécifique 10 mCi/mM) marqué sur les six carbones du noyau. Les quantités de substance radioactive réellement absorbées et les caractéristiques du matériel végétal sont résumées dans le tableau XXXV.

TABLEAU XXXV

Radioactivités absorbées (en µCi) et caractéristiques du matériel végétal lors de l'incorporation d'acide shikimique ^{14}C à des galles et à des rameaux de Chêne

Nature des organes	Nombre	Durées de métabolisation en h	µCi absorbées	Masses des échantillons en mg	
				Mat. frais	Mat. sec
Rameaux de Chêne	1	4	3,94	1 300	345
	1	10	3,94	1 246	350
	1	23	3,94	1 756	578
Galles de Biorhiza	2	4	3,04	5 980	1 117
	2	10	3,06	6 820	1 211
	2	23	3,12	6 920	1 139
Galles de Neuroterus	8	4	3,16	1 700	104
	8	10	3,16	1 709	104
	8	23	3,16	2 377	125

Les résultats des déterminations effectuées sur les acides aminés (tableau XXXVI) montrent pour les trois organes une incorporation de la radioactivité de l'acide shikimique dans la tyrosine et la phénylalanine. De même que chez la plante-hôte, la biosynthèse des acides aminés aromatiques procède donc, chez les galles, par la voie de l'acide shikimique.

TABLEAU XXXVI

Evolution de la radioactivité totale de la tyrosine et de la phénylalanine après incorporation d'acide shikimique ^{14}C à des galles de Biorhiza, de Neuroterus et à des rameaux de Chêne. Mise en évidence du marquage des acides aminés dicarboxyliques. Résultats exprimés en dpm/g de mat. sec

Nature des acides aminés	Durées de métabolisation en h	Rameaux de Chêne	Galles de Biorhiza	Galles de Neuroterus
Tyr	4	3 244	36 067	174 678
	10	7 266	44 485	209 613
	23	3 928	29 307	108 562
Phe	4	13 833	75 226	183 412
	10	13 582	40 268	128 097
	23	4 452	16 877	47 043
Asp	4	3 652	1 854	7 860
Glu	4	12 296	1 546	0

La métabolisation du précurseur alicyclique conduit également dans les trois organes à un marquage des acides glutamique et aspartique ; mais alors que chez le Chêne l'acide glutamique constitue le composé le plus radioactif, dans les galles, au contraire, l'acide aspartique est toujours l'acide aminé dicarboxylique le plus fortement marqué.

B.- COMPARAISON DES ACTIVITES SPECIFIQUES

Pour la durée de métabolisation la plus courte (figure 20), les activités spécifiques des deux acides aminés aromatiques, celle de la tyrosine surtout, sont plus élevées dans les galles que dans les rameaux ; leurs vitesses de formation sont donc plus rapides dans les cécidies. Ce résultat, joint aux données du tableau XXXVI, semble montrer que pour une même masse de matériel sec, les galles peuvent former, plus rapidement que le végétal témoin, des quantités plus importantes de tyrosine et de phénylalanine. Il permet aussi de conclure que les cécidies possèdent un équipement enzymatique suffisant pour synthétiser la totalité des acides aminés aromatiques qu'elles renferment.

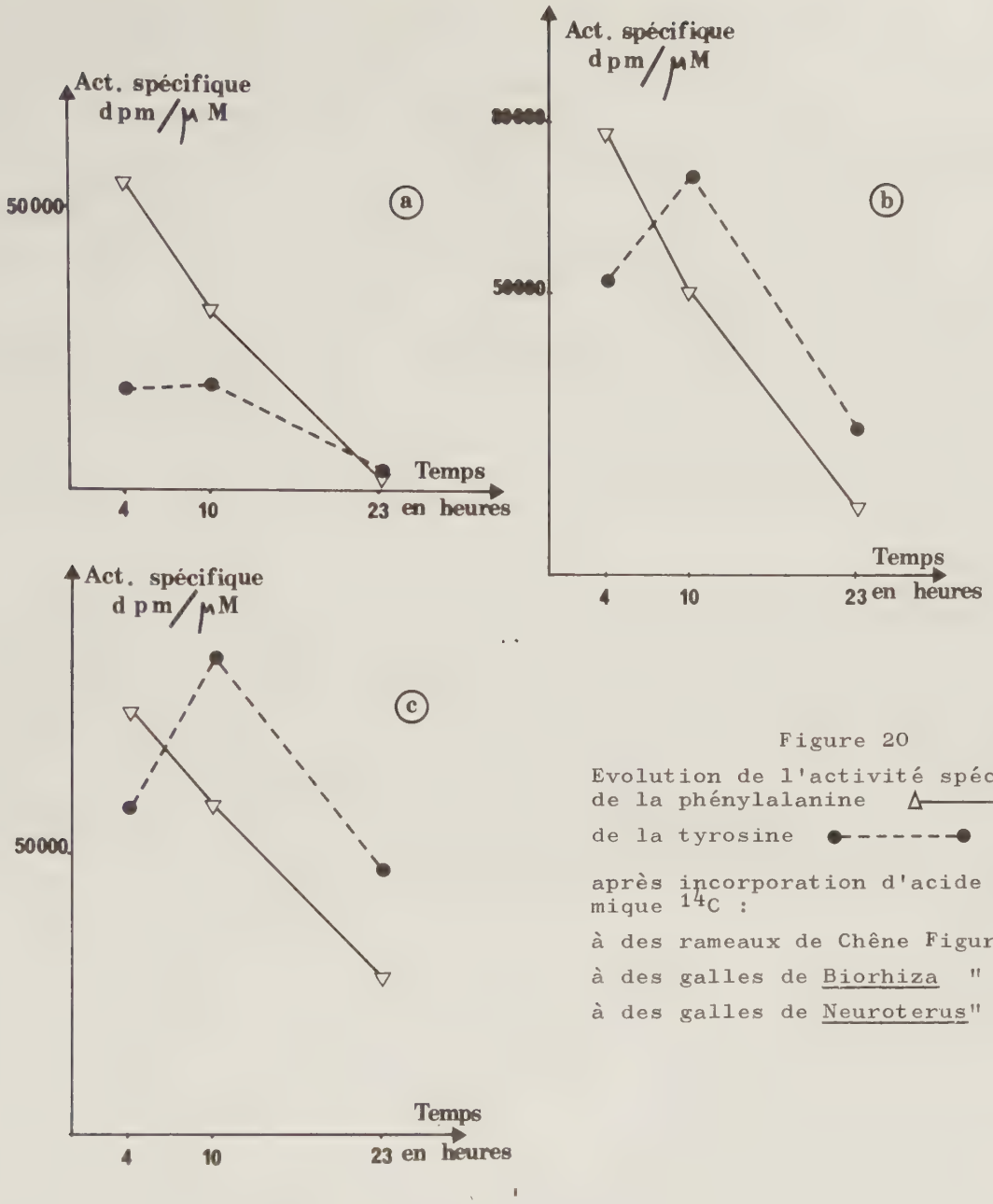


Figure 20

Evolution de l'activité spécifique
de la phénylalanine △——△
de la tyrosine ●- - - - - -●

après incorporation d'acide shikimique ^{14}C :

à des rameaux de Chêne Figure 20 a
à des galles de Biorhiza " 20 b
à des galles de Neuroterus" 20 c

L'étude cinétique de l'évolution de la radioactivité fait apparaître (figure 20) que dans les trois organes, la phénylalanine constitue le composé le plus rapidement synthétisé à partir de l'acide shikimique ; en effet, sa radioactivité totale d'une part, son activité spécifique d'autre part, sont nettement supérieures à celles de la tyrosine pour la durée de métabolisation la plus courte (4 heures).
L'acide aminé hydroxylé est synthétisé à une vitesse moins rapide puisque son activité spécifique maximale n'est atteinte que pour une durée de métabolisation de 10 heures.
La variation inverse des activités spécifiques des deux acides aminés aromatiques, entre 4 et 10 heures, fait penser à une formation possible de la tyrosine à partir de la phénylalanine, sous l'action de la phénylalanine-hydroxylase. Dans le cas de la plante-hôte, cette possibilité est envisagée en détail dans le chapitre III consacré aux transaminases (page 131).

A l'examen du tableau XXXVI et de la figure 20 il apparaît une grande différence entre les galles et les rameaux. Dans les premières, et pour des durées de métabolisation de 10 et 23 heures, la radioactivité totale et l'activité spécifique de la tyrosine sont supérieures aux valeurs obtenues pour la phénylalanine ; dans le végétal sain, au contraire, les radioactivités totales incorporées dans la tyrosine restent constamment inférieures à celles de la phénylalanine (tableau XXXVI).

La diminution rapide de l'activité spécifique de ces deux composés pose encore le problème de leur devenir. Les résultats obtenus, au chapitre précédent, montrent que cette diminution est, pour une part, imputable à leur incorporation dans les protéines. On sait également que chez le Chêne, la phénylalanine constitue un excellent précurseur des acides phénoliques (MARIGO, 1970). Enfin, dans le cas de la tyrosine, on peut envisager sa dégradation pour former des composés aliphatiques (glucose, fructose,...) ainsi que l'ont mis en évidence IBRAHIM et al. (1961) chez de nombreuses autres espèces végétales.

C.- CONCLUSIONS

La fourniture d'acide shikimique ^{14}C aux galles de Neuroterus et Biorrhiza a permis de démontrer l'existence de la voie de l'acide shikimique dans ces zoocécidies. Ce résultat, joint aux données du chapitre précédent, montre qu'à partir du glucose, ces organes peuvent élaborer eux-mêmes les acides aminés aromatiques nécessaires à la vie de l'insecte qu'ils renferment. Par rapport au végétal sain, on constate surtout une incorporation moindre de la radioactivité de l'acide shikimique dans les acides aminés dicarboxyliques et une synthèse plus active de la tyrosine dont l'importance est primordiale lors de la mue imaginale (BRUNET, 1963).

CHAPITRE II

LA CHORISMATE-MUTASE

A.- FORMATION DE LA TYROSINE ET DE LA PHENYLALANINE A PARTIR DES ACIDES CHORISMIQUE ET PREPHENIQUE

B.- ETUDE DE LA CHORISMATE-MUTASE

I.- MATERIEL ET METHODES

a.- Matériel végétal

b.- Extractions et purifications

c.- Détermination de l'activité enzymatique

II.- REPARTITION DE LA CHORISMATE-MUTASE DANS LES DIFFERENTS ORGANES DES JEUNES CHENES

a.- Vérification du protocole d'extraction

b.- Répartition de l'enzyme dans les différents organes

III.- ETUDE DES PROPRIETES DE LA CHORISMATE-MUTASE

a.- Influence du pH

b.- Influence de la concentration en substrat

c.- Influence de la concentration en enzyme et du temps

d.- Influence de la température

e.- Etude de la stabilité de l'enzyme

f.- Etude des propriétés allostériques de l'enzyme

IV.- MISE EN EVIDENCE ET PROPRIETES DE LA CHORISMATE-MUTASE DES GALLES DE *Neuroterus quercusbaccarum* et *Biorhiza pallida*

a.- Mise en évidence

b.- Propriétés allostériques

V.- CONCLUSIONS

CHAPITRE II

LA CHORISMATE-MUTASE

L'acide chorismique fut le dernier intermédiaire identifié dans la voie de l'acide shikimique. Il fut isolé par GIBSON (1964) du milieu de culture d'un mutant d'A. aerogenes (souche 62-1). EDWARDS et JACKMAN (1965) en déterminèrent la structure et l'identifièrent à l'acide α (5-carboxy 1,2 dihydro-2-hydroxyphénoxy) acrylique.

Chez les bactéries, l'acide chorismique est situé à un carrefour métabolique très important : il conduit non seulement à la formation des acides aminés aromatiques mais aussi à celle de nombreuses vitamines ou facteurs de croissance (GIBSON et PITTARD, 1968 ; LINGENS, 1968).

En dehors de son rôle de substrat pour de nombreuses réactions enzymatiques, l'acide chorismique intervient aussi dans la régulation de la biosynthèse des acides aminés aromatiques en rétroinhibant l'activité de la DAHP synthétase de Bacillus subtilis (JENSEN et NESTER, 1965).

Dans une revue récente, LINGENS (1968) a effectué une mise au point sur le rôle métabolique de l'acide chorismique. Je ne m'étendrai donc pas sur tous les systèmes enzymatiques impliqués dans les transformations subies par cet intermédiaire et je me limiterai plus particulièrement aux voies qui conduisent à la tyrosine et à la phénylalanine.

Les deux étapes de la biosynthèse des acides cétoniques aromatiques à partir de l'acide chorismique sont figurées sur le schéma 1, page 97 . Ces transformations sont catalysées par des systèmes enzymatiques complexes et les études réalisées sur ces enzymes sont surtout axées sur la recherche :

- de l'existence d'enzymes isofonctionnelles ou de complexes enzymatiques,
- de leur intervention dans les processus de régulation de la biosynthèse des acides aminés aromatiques.

Les isoenzymes et les complexes enzymatiques

Le nombre des isoenzymes de la chorismate-mutase ou leurs associations à d'autres activités enzymatiques dépendent essentiellement de l'organisme considéré.

Le cas le plus simple se rencontre chez Neurospora et Pseudomonas dans lesquels la chorismate-mutase ne présente qu'une seule forme moléculaire. Mais le plus souvent, il existe deux isoenzymes assurant la conversion de l'acide chorismique en acide préphénique. Chez Claviceps paspali (LINGENS et al., 1967 a), ces deux chorismate-mutases sont facilement séparables de la préphénate déshydrogénase et de la préphénate déshydratase par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium.

Par contre, chez E. coli, Salmonella typhimurium et A. aerogenes, deux systèmes enzymatiques interviennent dans l'utilisation de l'acide chorismique pour la synthèse des acides p.hydroxyphénylpyruvique et phénylpyruvique :

- une enzyme ou un complexe enzymatique possédant les activités de la chorismate-mutase et de la préphénate déshydrogénase ; la catalyse aboutit à la transformation de l'acide chorismique en acide p.hydroxyphénylpyruvique par l'intermédiaire de l'acide préphénique (COTTON et GIBSON, 1965 ; DAYAN et SPRINSON, 1968). Cette isoenzyme fut appelée chorismate-mutase T par COTTON et GIBSON (1965).

- une enzyme ou un complexe enzymatique renfermant la chorismate-mutase et la préphénate déshydratase (COTTON et GIBSON, 1965 ; SCHMIT et ZALKIN, 1969). Cette isoenzyme fut appelée chorismate-mutase P.

Enfin, le cas de complexité extrême se rencontre chez B. subtilis, organisme chez lequel LORENCE et NESTER (1967) ont caractérisé 3 chorismate-mutases différentes. Chez cette bactérie, les trois mutases, toujours distinctes des préphénate-aromatases, se trouvent associées à la DAHP synthétase et sans doute à la shikimate kinase (NESTER et al., 1967).

Les processus de régulation

Les bactéries ont développé au cours de l'évolution des systèmes, fort différents et souvent complexes, de régulation des enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides aminés aromatiques (LINGENS, 1968 ; GIBSON et PITTARD, 1968). En règle générale, lorsqu'une action existe, on constate une rétroinhibition et parfois une répression des préphénate-aromatases et de la chorismate-mutase par la tyrosine et la phénylalanine ; par contre, souvent le tryptophane induit ou active la chorismate-mutase.

Chez les végétaux supérieurs, l'étude de l'intervention des acides préphénique et chorismique dans l'élaboration des acides aminés aromatiques n'a fait l'objet que d'un nombre très restreint d'investigations.

En présence d'acide glutamique et de NADP, des extraits acellulaires de Phaseolus aureus peuvent transformer l'acide préphénique en tyrosine et en phénylalanine (GAMBORG et SIMPSON, 1964). Chez ce même végétal, GAMBORG et KEELY (1966) ont étudié les propriétés de la préphénate déshydrogénase : elle diffère de celle des bactéries par la nature de son cofacteur (NADP au lieu de NAD).

Enfin, récemment, COTTON et GIBSON (1968) ont mis en évidence la chorismate-mutase dans les cotylédons de jeunes plantes de Pois (Pisum sativum) et ont montré qu'elle possédait des propriétés allostériques proches de celle de N. crassa. A ma connaissance, il s'agit de la seule étude effectuée sur la chorismate-mutase chez les végétaux supérieurs.

Dans ce chapitre, après avoir montré l'intervention des acides chorismique et préphénique dans la biosynthèse des acides aminés aromatiques, j'ai étudié les propriétés de la chorismate-mutase des feuilles de Q. pedunculata et des galles de Neuroterus quercusbaccarum et de Biorhiza pallida.

A.- FORMATION DE LA TYROSINE ET DE LA PHENYLALANINE A PARTIR DES ACIDES CHORISMIQUE ET PREPHENIQUE

On fait absorber à des tiges feuillées de Chêne, soit 10 µM de chorismate de sodium, soit 20 µM de préphénate de potassium en solution dans 1 ml d'eau distillée. Les durées de métabolisation sont de 6 heures dans le cas de l'acide chorismique, de 6 et 10 heures dans le cas de l'acide préphénique. Après fixation à l'azote liquide, puis extraction, on procède au dosage des acides aminés selon les protocoles déjà décrits.

TABLEAU XXXVII

Influence des acides chorismique et préphénique sur les teneurs en tyrosine et en phénylalanine des feuilles de Quercus pedunculata. Résultats exprimés en µM/g de matériel sec

Acides aminés	Teneurs du témoin	Teneurs des essais après incorporation d'acides : chorismique 6 h	préphénique 6 h	préphénique 10 h
Tyr	0,08	0,81	1,56	1,99
Phe	0,16	1,51	2,66	4,61
Rapport Phe/Tyr	2,0	1,9	1,7	2,3

Les résultats obtenus (tableau XXXVII) montrent que les acides chorismique et préphénique sont d'excellents précurseurs de la tyrosine et de la phénylalanine.

Dans les deux cas, la phénylalanine est synthétisée plus rapidement que la tyrosine. Il faut souligner que les quantités, dosées à la suite de l'incorporation des deux précurseurs, respectent le rapport des concentrations initiales des deux acides aminés (tableau XXXVII). La surcharge des pools n'a donc pas perturbé le métabolisme du végétal. Ce résultat permet de déduire que la formation plus rapide de phénylalanine constatée lors des incorporations de glucose, d'acide shikimique, d'acide chorismique ou d'acide préphénique provient sans doute d'une métabolisation plus intense de ce dernier intermédiaire vers l'acide phénylpyruvique que vers l'acide p.hydroxyphénylpyruvique, précurseurs cétoniques respectivement de la phénylalanine et de la tyrosine.

Ces données préliminaires m'ont amené à rechercher, chez Q. pedunculata, les enzymes intervenant dans l'utilisation des acides chorismique et préphénique dans la biosynthèse des acides aminés aromatiques. Des trois enzymes permettant la transformation du premier précurseur en acides cétoniques aromatiques, je n'ai pu mettre en évidence que la chorismate-mutase. La recherche des enzymes métabolisant l'acide préphénique, préphénate déshydratase et préphénate déshydrogénase, a toujours été négative, peut-être par suite d'une grande instabilité de ces biocatalyseurs. GIBSON et

COTTON (1968) chez le Pois, WEBER et BOCK (1969) chez les Algues, ne purent, non plus, mettre en évidence ces enzymes et à l'heure actuelle, la préphénate déshydratase n'a jamais été caractérisée chez les végétaux supérieurs.

B.- ETUDE DE LA CHORISMATE-MUTASE

I.- MATERIEL ET METHODES

a.- Matériel végétal

Dans le cas du Chêne les études sont effectuées, soit sur les différents organes de plantes cultivées en salle conditionnée, soit sur des feuilles prélevées dans la nature sur des rameaux de printemps ou les pousses de la St Jean. Les galles de Biorhiza pallida sont récoltées le 7 mai 1969 sur Quercus sessilis et celles de Neuroterus quercusbaccarum le 10 mai sur Quercus pubescens.

b.- Extractions et purifications

1.- Remarques préalables aux extractions enzymatiques

La présence, chez le Chêne, de grandes quantités de tannins et de substances phénoliques (BOUDET et GADAL, 1965 ; FEENY et BOSTOCK, 1968) constitue un double obstacle à l'étude des enzymes chez ce végétal :

- en insolubilisant les protéines, les tannins rendent les extractions enzymatiques très délicates,
- en présence de l'oxygène de l'air les polyphénols solubles s'oxydent en quinones, substances inhibitrices très puissantes des enzymes (ANDERSON et ROWAN, 1967).

Pour obtenir des extraits enzymatiques actifs, j'ai donc été amené à opérer, d'une part, en présence de substances complexant les tannins et, d'autre part, d'un agent antioxydant.

Pour éliminer les tannins j'ai utilisé, soit le polyclar AT, polymère insoluble du polyvynilpyrrolidone dans la proportion de 0,5 g à 1 g par g de matériel sec, soit le polyéthylène glycol en solution dans le tampon d'extraction (JONES, 1965).

Le polyclar AT permet d'obtenir des extraits très limpides qui ne brunissent que faiblement au cours du temps. Malheureusement, ces extraits ne possèdent pas toujours des activités élevées ni très reproductibles surtout lorsque le matériel renferme de grandes quantités de tannins. C'est la raison pour laquelle j'ai utilisé de préférence le polyéthylène glycol (soit seul, soit en présence de polyclar), agent protecteur qui donne des extraits enzymatiques plus troubles mais en général plus actifs.

L'antioxydant retenu est le thioglycolate de sodium (ANDERSON et ROWAN, 1967) ; il permet une bonne conservation des extraits bruts et se révèle moins inhibiteur que le métabisulfite (GADAL et al., 1969).

2.- Extractions

Dans 40 ml de tampon phosphate monopotassique-bipotassique 0,1 M de pH 7,5 renfermant 1 % de polyéthylène glycol et du thioglycolate de sodium M/100, on broie pendant 1 mn à la vitesse maximale du broyeur à hélice "Buhler" 3 g de matériel sec (feuilles, tiges ou racines) en présence de 3 g de polyclar AT. Un bain réfrigérant à -10° C permet de maintenir la température du milieu d'extraction au voisinage de 0° C. On laisse l'extraction se poursuivre pendant 5 mn à la température de 4° C,

et on homogénéise par broyage au "Turrax". On centrifuge ensuite ce broyat (20 mn à 16 000 g) et on recueille le liquide surnageant (extrait E_1). On remet en suspension le culot de centrifugation dans 40 ml de tampon de pH 7,5 et, après centrifugation, on recueille l'extrait E_2. Enfin, dans un but de vérification, j'ai parfois procédé à un troisième épuisement du culot de la seconde extraction (extrait E_3).

3.- Purifications

Ces extraits sont débarrassés des substances de faibles masses moléculaires par passage sur une colonne de Séphadex G. 50. Des tentatives de purifications plus poussées de l'enzyme (sur DEAE-cellulose, DEAE-Séphadex) ont toujours conduit à la perte totale des activités enzymatiques. La plupart des études sur la chorismate-mutase ont donc été effectuées sur des solutions enzymatiques uniquement purifiées sur Séphadex G. 50.

c.- Détermination de l'activité enzymatique

1.- Principe

L'activité de la chorismate-mutase est mesurée par dosage spectrophotométrique du phénylpyruvate provenant de la transformation en milieu acide du préphénate engendré lors de l'action enzymatique :

$$\text{Ac. chorismique} \xrightarrow{\text{chorismate-mutase}} \text{Ac. préphénique} \xrightarrow{H^+} \text{Ac. phénylpyruvique} \xrightarrow{OH^-} \text{forme tautomère}$$

de l'acide phénylpyruvique (maximum d'absorption à 320 nm) (GIBSON, 1964).

2.- Protocole expérimental

On place au bain-marie à 30° C les milieux correspondant à la composition indiquée dans le tableau XXXVIII.

TABLEAU XXXVIII

Composition des milieux réactionnels pour l'étude de la chorismate-mutase

	E	TC	TV	TB
Solution enzymatique	2 ml	0	2 ml	0
Solution enzymatique portée 30 mn à 100° C	0	0	0	2 ml
Solution ac. chorismique dans le tampon, 2,5 µM/ml	1 ml	1 ml	0	1 ml
Tampon phosphate 0,1 M pH 7,5	0	2 ml	1 ml	0
Température : 30° C				

A des intervalles de temps réguliers, en général toutes les 15 minutes, on prélève 0,5 ml de chaque milieu que l'on acidifie par 0,5 ml d'HCl N. On laisse la transformation quantitative de l'acide préphénique en acide phénylpyruvique s'opérer pendant 10 mn à 37° C (GIBSON, 1964) puis on ajoute 5 ml de soude N et on effectue les lectures à 320 nm contre un "à blanc" ne contenant que de la soude N. Le témoin acide chorismique (TC) permet de connaître la transformation spontanée et non négligeable de

l'acide chorismique en acide préphénique ; le témoin végétal (TV) l'augmentation de la densité optique de l'extrait en fonction du temps ; elle est souvent faible. Le témoin renfermant l'enzyme dénaturée (TB) conduit à une transformation égale à la dégradation chimique (TC).

La densité optique correspondant à l'acide phénylpyruvique (PPyr) provenant de l'acide préphénique formé par catalyse enzymatique est donc égale à :

$$D.O.\ PPyr. = D.O.\ E - (D.O.\ TV + D.O.\ TC)$$

La quantité de phénylpyruvate formé est calculée en utilisant un coefficient d'extinction moléculaire déterminé expérimentalement et égal à 15 000.

3.- Mise en évidence de l'enzyme - Identification de l'acide phénylpyruvique

Les résultats du tableau XXXIX se rapportent à la recherche de la chorismate-mutase dans les feuilles de Quercus pedunculata.

TABLEAU XXXIX

Mise en évidence de la chorismate-mutase dans les feuilles de Quercus pedunculata

Temps en minutes	D.O. E	D.O. TV	D.O. TC	D.O. PPyr.	µM PPyr. formé
15	0,270	0,016	0,065	0,189	0,456
30	0,400	0,012	0,070	0,318	0,768

Après 30 minutes d'action, on vérifie que l'absorption déterminée à 320 nm est due à la transformation de l'acide préphénique en acide phénylpyruvique. Par addition directe de soude à l'essai enzymatique, l'absorption à 320 nm est négligeable et correspond à celle de l'acide préphénique (PLIENINGER, 1962). Après action préalable de l'acide chlorhydrique pendant 10 minutes à 37° C, apparaît en milieu basique le spectre d'absorption caractéristique de l'acide phénylpyruvique (figure 21).

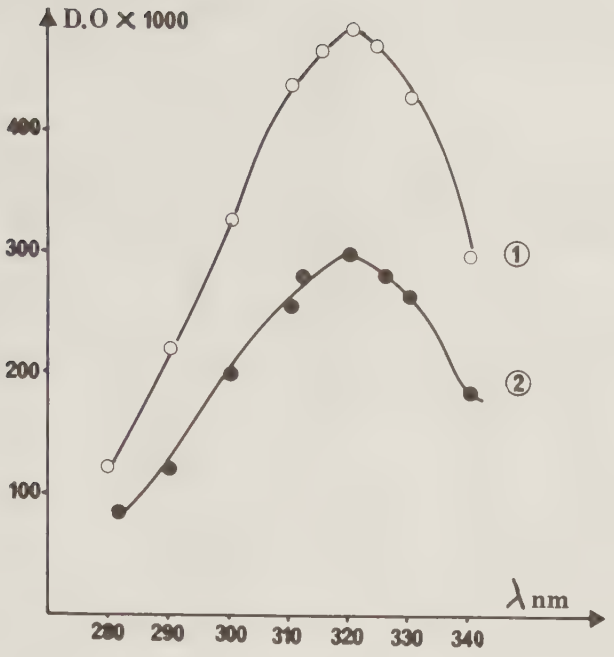


Figure 21

Identification de l'acide phénylpyruvique

Courbe 1 - Spectre d'absorption de l'acide phénylpyruvique témoin. Concentration : 1 ml d'une solution à 0,2 µM + 5 ml NaOH N.

Courbe 2 - Spectre d'absorption du produit de la réaction enzymatique. A chaque longueur d'onde : D.O. = (D.O. E - D.O. TV) - (D.O. TC - NaOH)

II.- REPARTITION DE LA CHORISMATE-MUTASE DANS LES DIFFERENTS ORGANES DES JEUNES CHENES

a.- Vérification du protocole d'extraction

La méthode spectrophotométrique utilisée oblige à effectuer les déterminations des activités enzymatiques sur des extraits. Avant d'étudier la distribution du biocatalyseur dans les différents organes de Quercus pedunculata, j'ai donc vérifié l'efficacité du protocole d'extraction en déterminant les quantités d'enzyme solubilisées par chacun des épuisements successifs (tableau XL).

La première extraction permet d'obtenir la solution enzymatique la plus concentrée ; elle convient donc à la détermination des propriétés de la chorismate-mutase. L'extrait E_2 renferme cependant la plus grande quantité d'enzyme, tandis que le dernier épuisement ne solubilise que peu de biocatalyseur. On peut donc considérer que la somme des activités mesurées dans les extraits E_1 et E_2 est représentative des quantités d'enzyme initialement présentes dans le matériel végétal. Pour étudier la répartition de la chorismate-mutase dans les plantes de Quercus pedunculata,

j'ai donc procédé pour chaque organe à deux extractions successives, les déterminations d'activité s'effectuant sur 2 ml des extraits réunis préalablement purifiés sur Séphadex G. 50 (tableau XL).

TABLEAU XL

Détermination du nombre d'extractions nécessaires à la solubilisation de la chorismate-mutase des feuilles de Quercus pedunculata. Résultats exprimés en µM d'acide préphénique formées en 15 minutes

Nature des extraits	Volumes après Séphadex G. 50	µM d'ac. préphénique formé/ml	Activités totales
E_1	30 ml	0,300	9,00
E_2	60 ml	0,168	10,08
E_3	60 ml	0,054	3,24

b.- Répartition de l'enzyme dans les différents organes

Dans cette étude j'ai retenu les trois stades de développement suivants :

- graines stratifiées pendant 5 semaines ; longueur de la racine 7 cm environ,
- plantes âgées de 19 jours, feuilles disposées en une seule rosette,
- plantes âgées de 58 jours possédant deux rosettes de feuilles (F. inf. et F. sup.). Dans ce cas, j'ai aussi analysé séparément les parties de la tige situées de part et d'autre de la première rosette de feuilles (ces portions de tiges sont désignées sur la figure 22 par les abréviations T. inf. et T. sup.).

La chorismate-mutase est très inégalement répartie dans les organes des jeunes Chênes. Les teneurs les plus importantes se rencontrent dans les racines et surtout dans les tiges jeunes encore peu lignifiées (partie inférieure de la tige des plantes de 19 jours) ; dans les feuilles nouvellement développées, on note aussi des activités élevées.

Au cours du vieillissement des organes on observe généralement une diminution des taux d'enzyme ; abaissement surtout marqué dans les tiges et les racines des Chênes de 58 jours. Le cas des feuilles est plus nuancé ; chez la jeune plante de deux mois, la teneur est plus élevée dans les feuilles de la rosette supérieure que dans celles de la rosette inférieure, mais on constate par ailleurs que celles-ci présentent une activité plus grande que leurs homologues situées sur des Chênes âgés de 19 jours seulement.

J'ai retenu les feuilles comme source d'enzyme bien qu'elles soient moins riches en chorismate-mutase que les autres organes. En effet, à l'inverse des tiges, ces organes permettent d'obtenir facilement une masse importante de matériel végétal et, à la différence des racines, elles sont dépourvues de contaminations fongiques.

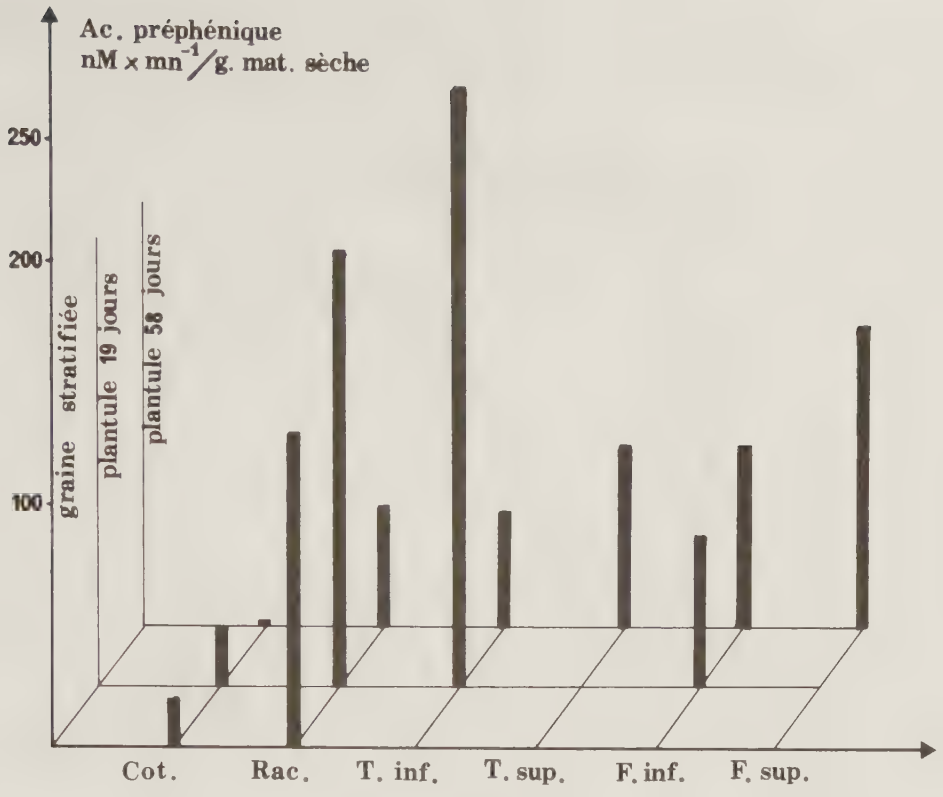


Figure 22

Importance et évolution de la chorismate-mutase dans les différents organes de Q. pedunculata au cours des premiers stades du développement

III.- ETUDE DES PROPRIETES DE LA CHORISMATE-MUTASE

a.- Influence du pH

La chorismate-mutase manifeste en général son activité maximale dans la zone alcaline ou faiblement acide des pH. Toutefois, la valeur optimale dépend de l'organisme étudié ; ainsi, le pH optimum, situé à 8,0 chez S. typhimurium (SCHMIT et ZALKIN, 1969), varie entre 6,4 et 8,9 selon l'isoenzyme étudiée chez B. subtilis (LORENCE et NESTER, 1967).

Dans le tampon phosphate, la chorismate-mutase de Q. pedunculata présente son activité maximale à pH 7,5 (figure 23, courbe 1). En milieu tricine-soude, ce maximum est déplacé à pH 8,1 (figure 23, courbe 2).

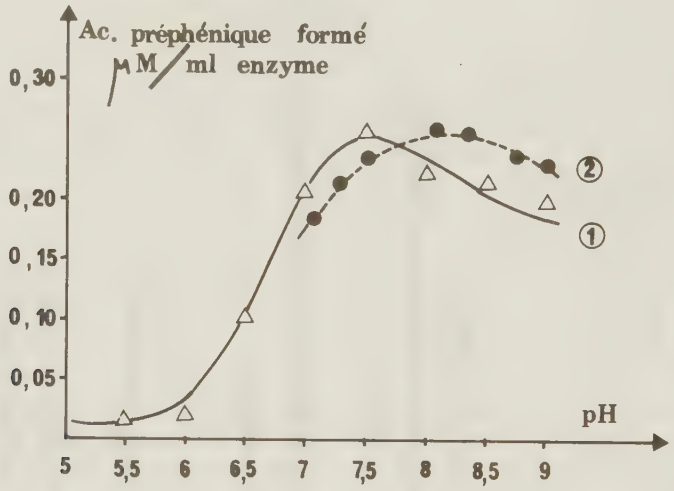


Figure 23

Influence du pH sur l'activité de la chorismate-mutase.
Courbe 1 : tampon phosphate - Courbe 2 : tampon tricine-soude

Néanmoins, aux valeurs optimales du pH, l'activité de l'enzyme n'est pas affectée par la nature du tampon (tableau XLI).

TABLEAU XLI

Influence de la nature des tampons sur l'activité maximale de la chorismate-mutase

Nature du tampon	Valeurs du pH	µM d'ac. préphénique formé en 15 mn
Phosphate	7,5	0,140
Tricine-soude	8,1	0,140

Les déterminations ultérieures seront effectuées à pH 7,5 dans le tampon phosphate.

b.- Influence de la concentration en substrat

La courbe reliant la vitesse d'action à la concentration en substrat a l'allure d'une section d'hyperbole (figure 24) ; elle obéit à l'équation de MICHAELIS. La valeur du $K_{m\ app.}$ déterminée par la méthode graphique de LINEWEAVER et BURK (1934) est de $2,4 \times 10^{-4}$ M. Elle est de l'ordre de grandeur de celles calculées pour les chorismate-mutases bactériennes : 8×10^{-5} pour S. typhimurium (SCHMIT et ZALKIN, 1969), $2,6 \times 10^{-3}$ pour B. subtilis (LORENCE et NESTER, 1967).

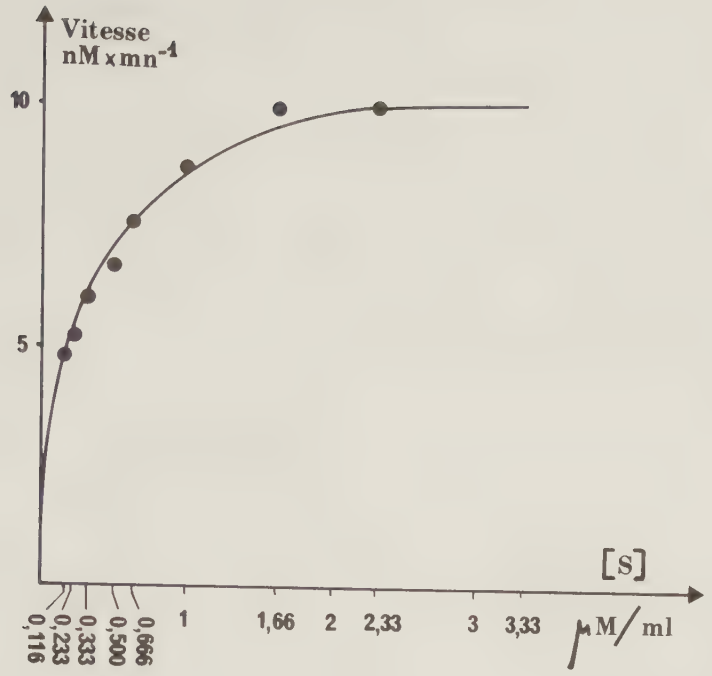


Figure 24

Vitesse de la réaction en fonction de la concentration en substrat

Pour les faibles concentrations, de nombreuses enzymes allostériques présentent des interactions coopératives entre les molécules de substrat. Cet effet se traduit pas une relation sigmoïdale entre la vitesse de la catalyse enzymatique et la concentration en substrat. La présence ou l'absence de ces interactions constitue généralement une caractéristique de chaque biocatalyseur.

Comme l'enzyme de Q. pedunculata, la chorismate-mutase de S. typhimurium (SCHMIT et ZALKIN, 1969) présente, en absence de tout inhibiteur, une relation hyperbolique entre la vitesse de la réaction et la concentration en substrat. Par contre, pour les enzymes extraites de N. crassa et de S. cerevisiae, BAKER (1966) et LINGENS et al. (1967 b) ont obtenu les courbes sigmoïdales caractéristiques des interactions coopératives. La chorismate-mutase fournit donc l'exemple d'une enzyme dont les caractéristiques varient selon le matériel d'origine.

Cette propriété sera à nouveau examinée lors de l'étude de la régulation de l'activité enzymatique.

c.- Influence de la concentration en enzyme et du temps

Pour des concentrations en protéines variant entre 300 et 3 000 µg par ml, la vitesse de la réaction enzymatique est directement proportionnelle à la quantité de biocatalyseur présent dans le milieu (figure 25).

En fonction du temps, et pour des teneurs variables en enzyme, la réaction est également d'ordre nul au moins durant les 20 premières minutes (figure 26).

En fonction de ce résultat j'ai généralement retenu un temps d'action de 15 minutes pour la détermination de l'activité de la chorismate-mutase.

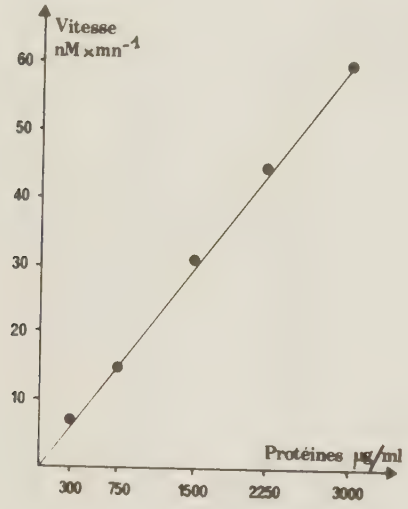


Figure 25

Influence de la concentration en enzyme sur la vitesse de la réaction

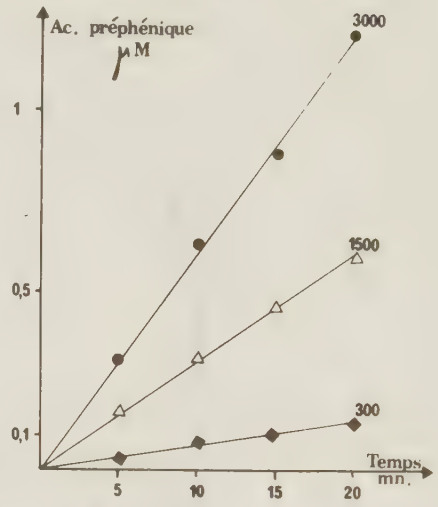


Figure 26

Influence du temps sur la formation d'acide préphénique. Concentrations en protéines : 300, 1 500 et 3 000 µg/ml

d.- Influence de la température

Pour un temps d'action de 15 minutes, la chorismate-mutase de Q. pedunculata présente une activité maximale aux environs de 40° C (figure 27). On constate également la persistance d'une activité enzymatique importante à 60° C.

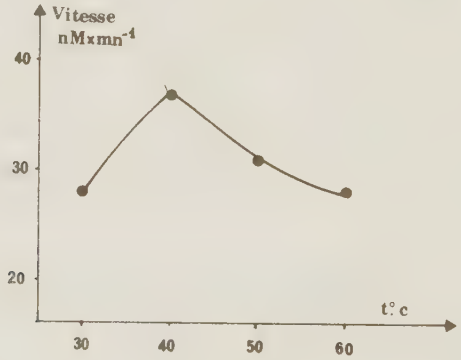


Figure 27

Influence de la température sur l'activité enzymatique

e.- Etude de la stabilité de l'enzyme

1.- Stabilité thermique

On porte à la température de 60° C un extrait enzymatique purifié sur Séphadex G. 50. Après des temps de chauffage variables, on refroidit la solution à 4° C et on effectue la mesure de l'activité enzymatique à 30° C.

La chorismate-mutase des feuilles de Chêne est sensible à la dénaturation thermique (figure 28) ; on note toutefois la persistance d'environ 20 % de l'activité initiale après 15 minutes de séjour à 60° C. Cette enzyme présente donc un comportement intermédiaire entre deux des isoenzymes : l'une thermostable (CM_3) et l'autre thermolabile (CM_2) de la chorismate-mutase de B. subtilis (LORENCE et NESTER, 1967).

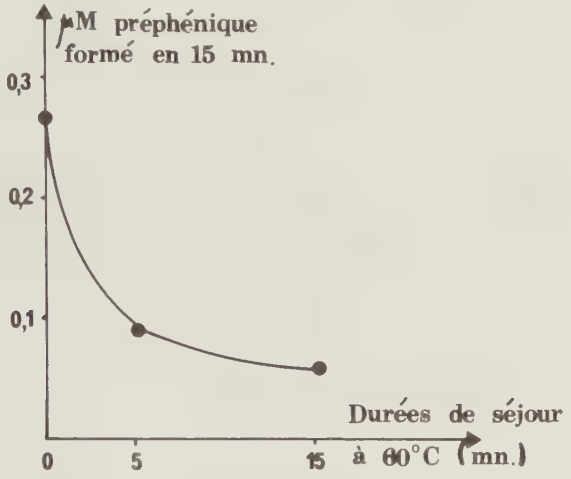


Figure 28

Stabilité de la chorismate-mutase en fonction de la température

Comme le montrent les résultats du tableau XLII, à la concentration de 1 µM/ml, le substrat ne présente aucun effet protecteur sur la dénaturation de l'enzyme portée 15 minutes à 60° C.

TABLEAU XLII

Influence de l'acide chorismique sur la stabilité de la chorismate-mutase. L'acide chorismique est éliminé de la solution enzymatique par passage sur une colonne de Séphadex G. 50

Nature de l'essai	µM d'ac. préphénique formé	
	15 mn	45 mn
Enzyme seule	0,024	0,066
Enzyme + ac. chorismique	0,030	0,066

2.- Stabilité en fonction du pH

L'enzyme présente une zone de stabilité maximale entre pH 6 et pH 8 avec un optimum à pH 7,5 : en deçà de pH 6 et au delà de pH 8 elle est dénaturée dans des proportions importantes (figure 29).

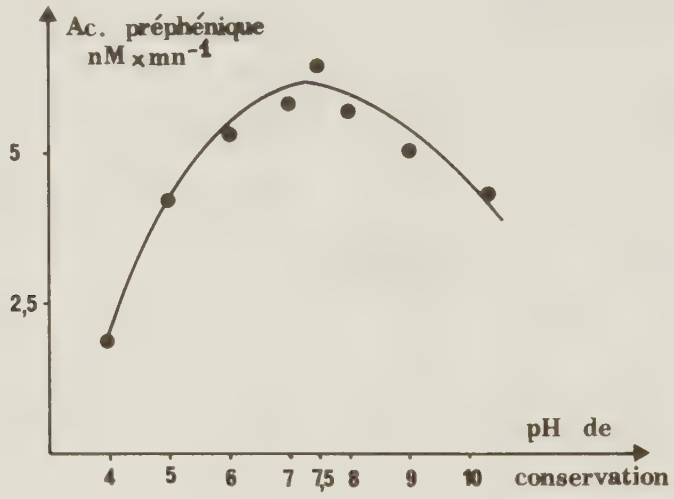


Figure 29

Stabilité de la chorismate-mutase en fonction du pH. Solution enzymatique purifiée sur Séphadex G. 100. Temps de séjour à 4° C : 12 heures

La similitude entre la courbe de stabilité et celle de l'activité enzymatique en fonction du pH (figure 23) permet de déduire que la faible activité catalytique observée aux valeurs acides du pH est due à la dénaturation de l'enzyme et non à la variation de son activité en fonction de la concentration en ions H^+.

3.- Conservation de l'enzyme au cours de la dessiccation du matériel végétal

Les difficultés inhérentes à la culture et à la récolte ne permettent d'effectuer des études sur le matériel frais que pendant quelques mois de l'année. Afin de disposer dans le temps d'un matériel homogène, j'ai donc recherché si l'enzyme se conserve au cours de la dessiccation du végétal et si elle n'est pas ensuite affectée par de longues durées de séjour à la chambre froide.

Les résultats du tableau XLIII mettent en évidence la stabilité de l'enzyme au cours de la lyophilisation des feuilles et de leur conservation ultérieure à 4° C. Le matériel lyophilisé constitue donc une bonne source d'enzyme et les feuilles déshydratées par ce procédé ont été largement utilisées dans cette étude pour l'extraction de la chorismate-mutase.

TABLEAU XLIII

Conservation de la chorismate-mutase dans les feuilles lyophilisées. Résultats rapportés à 1 g de substance sèche

Nature du matériel végétal	Ac. préphénique formé nM x mn^{-1}
Frais	183
Lyophilisé	150
Lyophilisé conservé 2 mois	200

Cette stabilité de l'enzyme se manifeste également en solution : des extraits conservent intact leur pouvoir catalytique après un séjour d'une semaine à la température de 4° C.

f.- Etude des propriétés allostériques de l'enzyme

1.- Mise en évidence de l'action des acides aminés aromatiques

L'enzyme de Q. pedunculata est sensible à l'action des trois acides aminés aromatiques ; elle est activée par le tryptophane mais rétroinhibée par les deux acides aminés dont elle commande la biosynthèse (tableau XLIV).

TABLEAU XLIV

Mise en évidence de l'influence des acides aminés aromatiques sur l'activité de la chorismate-mutase de Q. pedunculata. Concentration en ac. chorismique : 1 µM/ml. Résultats exprimés en % de l'activité déterminée en absence d'effecteurs

Nature des effecteurs	Concentrations	Activité en % du témoin
Tryptophane	$2,7 \times 10^{-5}$ M	146
Phénylalanine	$2,7 \times 10^{-4}$ M	75
Tyrosine	$2,7 \times 10^{-4}$ M	47
Tyrosine + Phénylalanine	$2,7 \times 10^{-4}$ M + $2,7 \times 10^{-4}$ M	48

A concentrations égales, la tyrosine possède un effet inhibiteur plus marqué que la phénylalanine. On constate que l'addition simultanée des deux effecteurs dans le milieu n'entraîne pas une inhibition supérieure à celle observée en présence de tyrosine seule. Ces deux faits indiquent qu'il n'existe probablement pas de sites allostériques distincts pour la tyrosine et la phénylalanine et aussi que ces sites interagissent préférentiellement avec l'acide aminé hydroxylé.

L'absence d'effets cumulatifs de deux inhibiteurs sur une même enzyme allostérique est généralement interprétée (COHEN, 1965 ; WEBER et BÖCK, 1969) comme une preuve de l'existence d'une seule forme de l'enzyme étudiée. Ce résultat rejoint les conclusions de COTTON et GIBSON (1968) et montre, qu'à la différence de beaucoup de microorganismes, il n'existe sans doute chez les végétaux supérieurs qu'une seule forme moléculaire de la chorismate-mutase.

2.- Activation par le tryptophane

Sur l'enzyme seule, l'activation maximale par le tryptophane est atteinte pour une concentration de 10^{-3} M environ. En plus de son rôle activateur, ce ligand allostérique possède aussi la propriété de lever l'inhibition de l'enzyme provoquée par la phénylalanine et la tyrosine. La forme sigmoïdale des courbes de la figure 30 montre l'existence, pour les faibles concentrations d'effets coopératifs entre les molécules de l'effecteur positif.

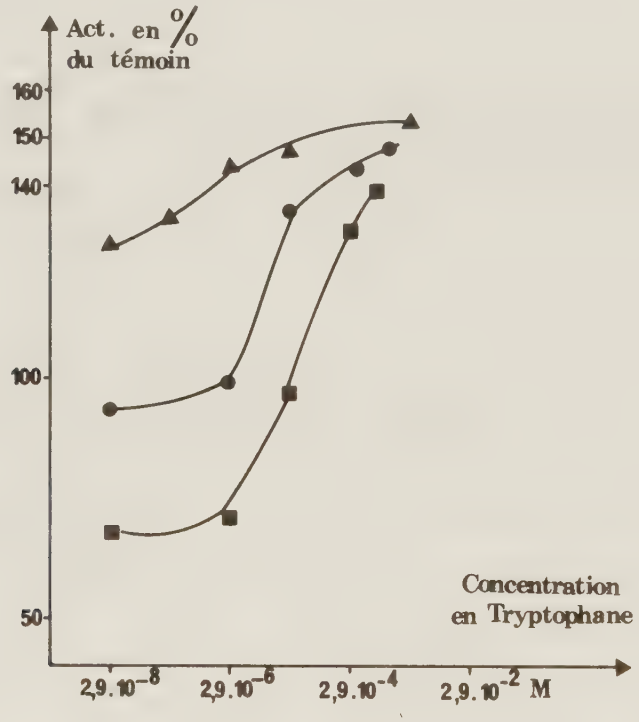


Figure 30

Influence de la concentration en tryptophane sur l'activité de la chorismate-mutase seule ▲——▲ ou inhibée par la tyrosine 2,7 x 10^{-3} M ■——■ par la phénylalanine 2,7 x 10^{-3} M ●——●

La suppression totale de l'inhibition ne nécessite qu'une concentration en tryptophane de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-5} M, soit environ 100 à 1 000 fois inférieure à celle des effecteurs négatifs, et même en présence de ceux-ci le composé indolique manifeste un effet activateur très proche de son action sur l'enzyme seule. On constate aussi que pour obtenir un même effet, il faut une concentration supérieure

dans le cas de la tyrosine que dans celui de la phénylalanine, ce qui confirme l'affinité plus grande du composé hydroxylé pour les sites allostériques de l'enzyme.

3.- Rétroinhibition par la tyrosine et la phénylalanine

L'étude de l'inhibition de l'enzyme par des concentrations croissantes de phénylalanine et de tyrosine (figure 31) fait également apparaître, comme dans le cas du tryptophane, l'existence d'effets coopératifs entre les molécules des effecteurs négatifs ; l'inhibition, pratiquement nulle dans les deux cas pour des concentrations inférieures à 10^{-4} M, se manifeste ensuite brusquement pour une faible variation de la concentration en effecteur.

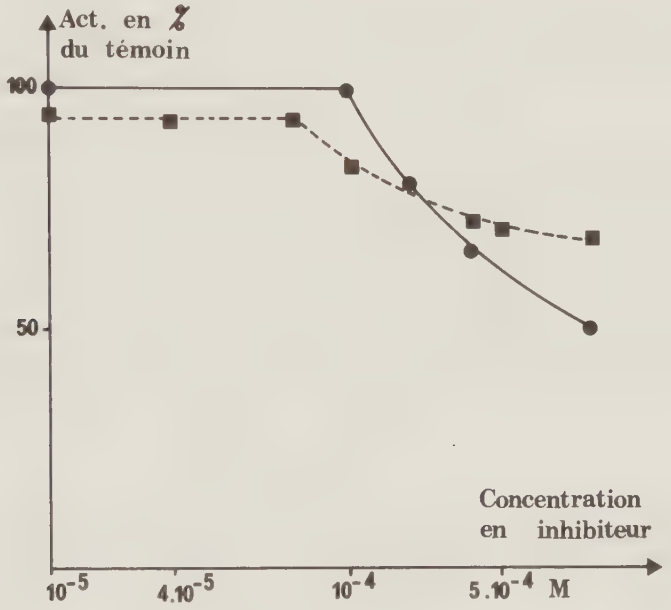


Figure 31

Influence de la tyrosine et de la phénylalanine sur l'activité de la chorismate-mutase. Concentration en ac. chorismique 10^{-3} M. Tyrosine : ●——● Phénylalanine : ■- - - -■

Pour une teneur constante en tyrosine (figure 32) la courbe reliant la vitesse de la réaction à la concentration en substrat présente l'allure d'une section d'hyperbole et obéit à la relation de MICHAELIS. La tyrosine agit donc sur la chorismate-mutase non purifiée de Q. pedunculata en diminuant la vitesse maximale de la réaction mais sans affecter de façon appréciable la valeur de la constante Km, mesure de l'affinité apparente de l'enzyme pour le substrat. Les enzymes allostériques dotées de cette propriété et présentant de plus des interactions coopératives entre les différents effecteurs appartiennent au système V (CHANGEUX et al., 1965 ; COHEN, 1965) par opposition aux enzymes du système K pour lesquelles l'effecteur modifie l'affinité apparente de l'enzyme pour le substrat. Ces dernières enzymes manifestent en présence de l'inhibiteur une relation sigmoïdale entre la vitesse de la réaction et la concentration en substrat. Malgré leur grande diversité de comportement à l'égard des acides aminés aromatiques, toutes les chorismate-mutases des champignons

(BAKER, 1966 ; LINGENS et al., 1967) ou des algues (WEBER et BÖCK, 1969) étudiées à ce jour appartiennent au système K.

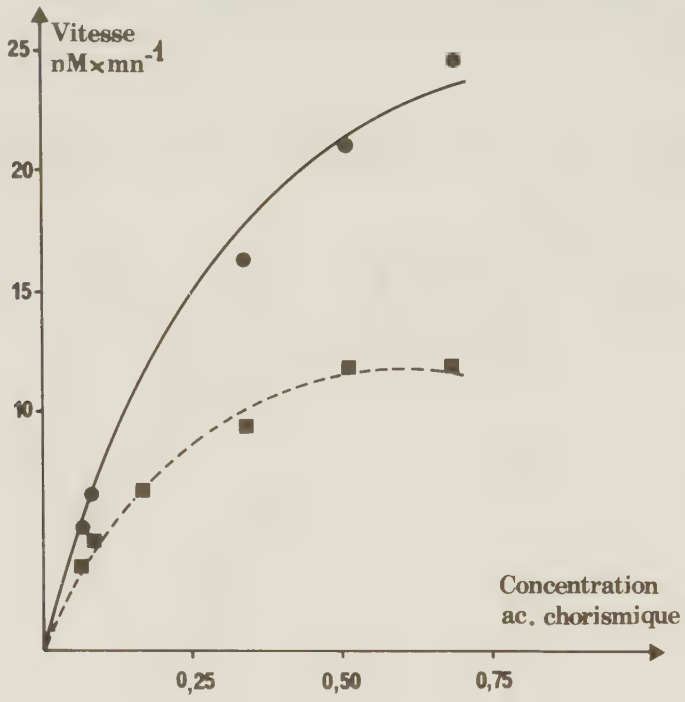


Figure 32

Influence de la tyrosine sur la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat

●——● : sans tyrosine

■- - - - - - ■ : en présence de tyrosine 6×10^{-4} M

Pour tenter d'expliquer les propriétés cinétiques originales de l'enzyme de Q. pedunculata (mises également en évidence lors de l'étude de la concentration en substrat) par rapport à celles de ces organismes inférieurs, deux hypothèses sont possibles. Il s'agit :

- soit d'un artéfact résultant d'une purification insuffisante de l'enzyme laissant en particulier persister dans la solution des effecteurs positifs ou négatifs. Ainsi LINGENS et al. (1967 a) ont montré que la chorismate-mutase de Claviceps paspali présente une relation vitesse - concentration en substrat hyperbolique, après une précipitation au sulfate d'ammonium, et que cette relation devient sigmoïdale après purification de l'enzyme sur cellulose echangeuse d'ions. De même COTTON et GIBSON (1968) ont mis en évidence, selon le degré de purification, des sensibilités différentes de la chorismate-mutase du Pois à l'action de la tyrosine, de la phénylalanine et du tryptophane. Dans l'optique de cette hypothèse, il est probable que le tryptophane, par suite de sa grande affinité pour l'enzyme, demeure lié à la protéine au cours des opérations de purification ; la présence de cet effecteur positif serait responsable des courbes hyperboliques obtenues (figure 32).

- soit au contraire d'une propriété spécifique de la chorismate-mutase des végétaux supérieurs. A l'appui de cette hypothèse, on peut signaler que d'autres enzymes de la voie de l'acide shikimique, telle de DAHP synthétase, appartiennent au système V et rappeler que WEBER et BÖCK (1969) ont obtenu une relation "vitesse - concentration en substrat" sigmoïdale en opérant sur une enzyme ayant été uniquement purifiée par dialyse.

Pour déterminer la validité de l'une ou l'autre de ces hypothèses des études sont actuellement en cours afin de mettre au point un protocole permettant de purifier l'enzyme sans la détruire.

IV.- MISE EN EVIDENCE ET PROPRIETES DE LA CHORISMATE-MUTASE DES GALLES DE Neuroterus quercusbaccarum ET DE Biorhiza pallida

a.- Mise en évidence

Dans le cas de ces organes, les extractions enzymatiques ont été effectuées sur des galles fraîches préalablement débarrassées de leurs larves. Les résultats des déterminations des activités enzymatiques (tableau XLV) démontrent la présence de la chorismate-mutase dans les deux cécidies et confirment l'existence de la voie de l'acide shikimique dans ces productions pathologiques. On constate aussi que la galle de Biorhiza présente une activité enzymatique supérieure à celle de Neuroterus.

TABLEAU XLV

Mise en évidence de la chorismate-mutase dans les galles de Neuroterus quercusbaccarum et de Biorhiza pallida. Résultats exprimés en µM d'acide préphénique formé en 15 mn par g. de matière sèche

Nature des organes	µM d'ac. préphénique formé en 15 minutes
Galles de Neuroterus	2,75
Galles de Biorhiza	6,80

b.- Propriétés allostériques

L'enzyme présente dans les galles est également sensible à l'action des acides aminés aromatiques (tableau XLVI). Le tryptophane présente un effet stimulateur important mais, par rapport aux résultats obtenus dans le cas de l'enzyme extraite des feuilles de Chêne, la différence la plus marquante réside dans l'inactivation pratiquement totale de l'enzyme des cécidies en présence de tyrosine.

TABLEAU XLVI

Influence des acides aminés aromatiques sur la chorismate-mutase des galles. Concentrations du substrat et des effecteurs : ac. chorismique et tryptophane 10^{-3} M, phénylalanine et tyrosine 4×10^{-3} M. Résultats exprimés en % des témoins

Nature des effecteurs	Galles de Neuroterus	Galles de Biorhiza
Tryptophane	200	159
Phénylalanine	71	46
Tyrosine	0	5

V.- CONCLUSIONS

Enzyme essentielle à l'élaboration des acides aminés aromatiques, la chorismate-mutase est présente dans le Chêne mais aussi dans les galles induites sur ce végétal par Neuroterus quercusbaccarum et Biorhiza pallida. Ceci confirme l'existence de la voie de l'acide shikimique chez ces productions pathologiques et leur plante-hôte.

L'enzyme est très inégalement répartie dans les différents organes des plantes cultivées en salle conditionnée. Peu active dans les cotylédons, bien représentée dans les racines et les feuilles, elle atteint son taux maximal dans les tiges. Au cours de la croissance, chaque organe manifeste un comportement particulier ; en règle générale pourtant, les teneurs élevées dans les organes jeunes s'abaissent au cours du vieillissement.

Facilement soluble, l'enzyme manifeste dans le tampon phosphate son activité maximale à pH 7,5. En fonction de la concentration en substrat, la vitesse de la réaction enzymatique varie selon l'équation de MICHAELIS (valeur du $K_{m\ app.} = 2,4 \times 10^{-4}$ M) mettant ainsi en évidence, à la différence des autres enzymes végétales étudiées à un stade de purification peu avancé (WEBER et BÖCK, 1969) l'absence d'interactions coopératives entre les molécules de substrat.

Sensible à l'action des trois acides aminés aromatiques, la chorismate-mutase est inhibée par les deux aminoacides dont elle commande la biosynthèse (tyrosine et phénylalanine). L'inhibiteur le plus efficace est le composé hydroxylé. Cette rétroinhibition est compensée par le rôle activateur du tryptophane qui possède, de plus, la propriété de lever l'inhibition provoquée par les deux autres acides aminés. La résultante de l'action de ces trois acides aminés aromatiques doit, sans doute, contribuer pour une part, au maintien de leurs faibles concentrations à l'état libre dans les différents organes du Chêne et dans les galles.

Enfin, à l'inverse de toutes les autres chorismate-mutases, bactériennes ou fongiques, l'enzyme de Q. pedunculata présente toutes les caractéristiques des enzymes allostériques appartenant au système V : manque d'effets coopératifs entre les molécules du substrat, existence d'interactions entre les effecteurs. Néanmoins,

le degré de purification très bas de l'enzyme étudiée et les données obtenues par LINGENS et al. (1967) et COTTON et GIBSON (1968) montrant la variation des propriétés allostériques en fonction du stade de purification ne permettent pas de considérer ce résultat comme définitif mais obligent à le vérifier sur une enzyme isolée.

CHAPITRE III

LA TRANSAMINATION DES ACIDES AMINES AROMATIQUES

A.- MATERIEL ET METHODES

I.- MATERIEL VEGETAL

II.- EXTRACTIONS ET PURIFICATIONS

III.- ACTIVITES ENZYMATIQUES

a.- Mise en évidence et mesure des activités transaminasiques des feuilles de Q. pedunculata et des galles de Neuroterus quercusbaccarum et Biorhiza pallida

b.- Transaminases des acides aminés aromatiques

c.- Glutamique-oxalacétique transaminase

d.- Glutamique-pyruvique transaminase

B.- LA TRANSAMINASE DES ACIDES AMINES AROMATIQUES CHEZ LE CHENE ET SES GALLES

I.- IMPORTANCE RELATIVE DES ACTIVITES TRANSAMINASIQUES DANS LES FEUILLES DE Q. pedunculata ET DANS LES GALLES DE Neuroterus quercusbaccarum ET DE Biorhiza pallida

II.- FORMATION DE TYROSINE ET DE PHENYLALANINE A PARTIR DES ACIDES p.HYDROXYPHENYLPYRUVIQUE ET PHENYLPYRUVIQUE

III.- REPARTITION DANS LA PLANTE ET EVOLUTION DE LA GLUTAMIQUE-PHENYLPYRUVIQUE TRANSAMINASE AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE Q. pedunculata

IV.- PURIFICATION ET ETUDE DE LA TRANSAMINASE DES ACIDES AMINES AROMATIQUES

a.- Résultat de la purification

b.- Influence du pH

c.- Influence de la concentration en substrats

d.- Influence de la concentration en enzyme et du temps

e.- Influence du pyridoxal-phosphate

f.- Réversibilité de la réaction

g.- Action de la température

h.- Influence des inhibiteurs

i.- Etude de la spécificité de l'enzyme

V.- ESSAI DE SEPARATION DES TRANSAMINASES DE Q. pedunculata

a.- Sur gels de SEPHADEX

b.- Sur DEAE-cellulose

c.- Sur hydroxylapatite

d.- Discussion des résultats

VI.- ACTION DE QUELQUES ACIDES CETONIQUES SUR LA GLUTAMIQUE-PHENYLPYRUVIQUE TRANSAMINASE

a.- Action de l'acide p.hydroxyphénylpyruvique

b.- Action des acides cétoniques aliphatiques

c.- Discussion des résultats

VII.- RESUME ET CONCLUSIONS

CHAPITRE III

LA TRANSAMINASE DES ACIDES AMINES AROMATIQUES

La mise en évidence par BRAUNSTEIN et KRITZMAN (1937) d'un transfert enzymatique du groupement aminé de l'alanine à l'acide α-cétoglutarique sans libération d'ammoniac à l'état libre ouvrit de nouvelles perspectives dans l'étude du métabolisme des acides aminés. Si les premières études ne permirent de caractériser qu'un nombre restreint de transaminases, le perfectionnement des techniques analytiques ainsi que la généralisation des méthodes chromatographiques montrèrent que la plupart des acides aminés, ou les acides cétoniques correspondant, peuvent intervenir dans les processus de transamination. Il apparut dès lors que les aminotransférases, en catalysant l'amination de la chaîne carbonée, soit au cours de son élaboration (lysine, arginine, sérine), soit après son édification définitive (acide aspartique, leucine, isoleucine, valine, tyrosine, phénylalanine), jouent un rôle essentiel dans la biosynthèse de la plupart des acides aminés. L'étude des propriétés de ces enzymes a surtout été réalisée sur les transaminases d'origine animale, la mieux connue étant la glutamate-oxalacétate aminotransférase du coeur de porc (VELICK et VAVRA, 1962).

Chez les végétaux, les transaminases catalysent la dernière étape de la série de transformations qui, à partir des composés azotés minéraux, permet l'amination des acides cétoniques par l'intermédiaire de l'acide glutamique. Mais en dépit de leur importance métabolique (FOWDEN, 1965), de la généralité de leur répartition (SANWAL et al., 1964) et de leurs caractéristiques propres, (GAMBORG et WETTER, 1963) les aminotransférases d'origine végétale constituent une classe d'enzymes mal connues ; leur spécificité est difficile à définir et on ignore le nombre de transaminases distinctes présentes chez un même végétal. Ces lacunes tiennent au fait que la plupart des travaux qui leur sont consacrés, surtout axés sur la mise en évidence des propriétés transaminasiques du végétal, négligent le plus souvent l'étude des protéines enzymatiques dont le nombre isolé demeure très restreint.

CRUICKSHANK et ISHERWOOD (1958) ont partiellement purifié, sans les séparer, les glutamique-oxalacétique et glutamique-pyruvique transaminases des jeunes plantules de Blé. Puis, à partir de ce même végétal ELLIS et DAVIES (1961) purent isoler la glutamate-oxalacétate aminotransférase et montrer qu'elle possédait des propriétés voisines de celle isolée du coeur de porc.

En dehors de ces deux enzymes, les transaminases les mieux étudiées chez les végétaux sont sans nul doute, les enzymes responsables de la transamination des acides aminés aromatiques. Découverte par WILSON et al. (1954) chez le Lupin, l'Orge et le Haricot, la transamination enzymatique de la phénylalanine et de l'acide α-cétoglutarique fut ensuite confirmée chez d'autres végétaux par de nombreux auteurs

(KRETOVITCH, 1958 ; GAMBORG et WETTER, 1963 ; BOUDET, 1965 ; USPENKAJA et al., 1965 ; SINHA et al., 1967). L'enzyme fut purifiée et étudiée successivement par GAMBORG et WETTER (1963) à partir de jeunes plantes de Phaseolus aureus, par GADAL et al. (1969) à partir de feuilles de Chêne et enfin par RED'KINA et al. (1969) à partir de jeunes Pois.

Dans ce travail, initialement axé sur l'étude des propriétés des transaminases responsables de la biosynthèse des acides aminés aromatiques, j'ai également été amené à caractériser les autres aminotransférases présentes dans les feuilles de Chêne, puis à étudier leurs comportements au cours des opérations de purification.

A.- MATERIEL ET METHODES

I.- MATERIEL VEGETAL

Le matériel végétal utilisé pour la purification et l'étude des propriétés des transaminases est constitué par des feuilles de Quercus pedunculata prélevées le 14 avril 1967, soit environ une semaine après l'éclatement des bourgeons, à 9 h du matin sur un arbre situé en plein champ. Après fixation à l'azote liquide les feuilles sont lyophilisées, conservées au congélateur à - 20° C. Elles sont broyées en poudre fine avant l'extraction. Lors de déterminations portant sur du matériel frais j'ai utilisé des feuilles de Q. pedunculata prélevées le 6 novembre 1968. Pour effectuer quelques expériences complémentaires, j'ai également utilisé des feuilles d'Arum italicum Mill. récoltées le 9 novembre 1968 et des feuilles de Phaseolus vulgaris provenant d'une culture en salle conditionnée (CAVALIE, 1969). Enfin les galles ont la même provenance que celles utilisées pour l'étude de la chorismate-mutase.

II.- EXTRACTIONS ET PURIFICATIONS

Les opérations d'extraction et de purification ont été réalisées à une température de 0 - 4° C. A l'aide d'un broyeur "Turrax", on homogénéise pendant une minute 2 g de poudre végétale dans 100 ml de tampon phosphate monopotassique-bipotassique 0,1 M de pH 7,5 renfermant 1 % de polyéthylène-glycol (M.M 6 000) et du thioglycolate de sodium à la concentration M/100. Afin de réduire encore les oxydations on fait barboter pendant une minute un courant d'azote dans la solution avant et après le broyage. On centrifuge 15 mn à 16 000 g ; le surnageant brun - clair obtenu, environ 95 ml, représente l'extrait brut.

Cet extrait est introduit sur une colonne de Séphadex G 50 (40 x 5 cm) équilibrée dans du tampon phosphate M/200 de pH 7,5 et l'élution est réalisée par ce même tampon. On constate une rétention des composés responsables de la coloration au sommet de la colonne ; les 160 ml recueillis après le Vo et renfermant l'enzyme sont additionnés de thioglycolate de sodium (concentration finale M/100) puis lyophilisés et le résidu obtenu repris par 20 ml d'eau glacée. Ces 20 ml sont déposés au sommet d'une colonne de Séphadex G 200 (57 x 4 cm) dont le développement s'effectue par du tampon phosphate 0,1 M de pH 7,5. Les fractions renfermant la transaminase sont réunies ; cette solution est introduite sur une colonne de Séphadex G 50 puis éluée par du tampon M/200 de pH 7,5.

On fixe cet éluat sur une colonne de DEAE-cellulose "Biorad" (10 x 0,9 cm) traitée selon le protocole de PETERSON et SÖBER (1962) et équilibrée par du tampon phosphate M/200 de pH 7,5. Deux types d'élution ont été utilisés :

- pour la purification de la glutamate-phénylpyruvate transaminase, l'élution s'effectue par des tampons de force ionique croissante : M/50, M/25, M/10, M/5.
- pour la séparation des différentes transaminases du Chêne, le développement de la colonne fait appel à un gradient linéaire compris entre les concentrations M/200 et M/5 du tampon phosphate. Pour réaliser ce gradient j'ai utilisé, soit le système d'élution du "Spectrochrom Beckman", soit celui décrit par PETERSON et SÖBER (1962).

Dans les deux cas, l'élution de la phénylalanine transaminase s'effectue pour une concentration voisine de M/25. Cette concentration se rapproche de celle utilisée par RED'KINA et al. (1969) (0,03 M et 0,05 M) pour éluer d'une colonne de DEAE-cellulose la glutamate-phénylpyruvate transaminase du Pois, mais elle diffère considérablement de celle nécessaire à l'élution de l'enzyme de Phaseolus aureus (M/5 en phosphate + M/4 en KCl) (GAMBORG, 1965).

Enfin, certains essais de purification ont été effectués par passage de la solution enzymatique sur une colonne d'hydroxylapatite (TISELIUS et al., 1956). Dans ce cas, on dépose les protéines en solution dans du tampon phosphate M/200 de pH 6,7 au sommet d'une petite colonne (1 x 5 cm) d'hydroxylapatite "Biorad", on rince la colonne par 20 ml de tampon de pH 6,7 M/200 puis on élue par du tampon phosphate de pH 7,5 de force ionique croissante. Cette méthode de purification a été peu utilisée car elle entraîne une perte importante de l'activité enzymatique et une diminution marquée de l'activité spécifique.

III.- ACTIVITES ENZYMATIQUES

a.- Mise en évidence et mesure des activités transaminasiques des feuilles de Q. pedunculata et des galles de Neuroterus quercusbaccarum et de Biorhiza pallida

Les aminotransférases les plus fréquemment rencontrées chez les végétaux catalysent l'une des deux réactions (SANWAL et al., 1964) :

$$\text{ac. glutamique} + \text{ac. cétonique} \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} \text{ac. } \alpha\text{-cétoglutarique} + \text{ac. aminé}$$

$$\text{alanine} + \text{ac. cétonique} \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} \text{ac. pyruvique} + \text{ac. aminé}$$

Dans une étude préliminaire, j'ai déterminé et comparé l'activité de ces différentes transaminases dans les feuilles de Chêne. Les réactions sont étudiées dans le sens 2 par dosage de l'acide glutamique ou de l'alanine formés à partir des différents acides aminés ou amides.

Pour pallier l'insolubilité éventuelle de certaines enzymes et éviter des témoins trop nombreux, j'ai utilisé une suspension végétale préparée comme suit :

On extrait selon le protocole déjà décrit, 2 g de feuilles lyophilisées, récoltées le 20 avril 1968 ; on centrifuge et on débarrasse l'extrait des substances de faibles poids moléculaires par passage sur une colonne de Séphadex G 50, puis on ajoute cet extrait purifié au culot d'extraction. Les essais enzymatiques sont réalisés sur 2 ml de cette suspension selon le protocole résumé dans le tableau XLVII.

TABLEAU XLVII

Composition des milieux enzymatiques pour la mise en évidence des transaminases du Chêne

Suspension enzymatique	2 ml
Pyridoxal phosphate 2,5 µM/ml	0,5 ml
Tampon phosphate 0,1 M pH 7,5	0,5 ml
Acide aminé dans le tampon pH 7,5 50 µM/ml	1 ml
Acide cétonique (acide α-cétoglutarique ou acide pyruvique) 50 µM/ml	1 ml
Température	30° C
Toluène	1 gtte

Après 4 heures d'action, on arrête la réaction par HCl 5 N, on évapore à sec, on reprend par 3 ml de tampon citrate de pH 2,2 et on dose, à l'"Amino acid Analyzer Beckman", l'acide glutamique ou l'alanine formés.

Pour la caractérisation d'un nombre plus restreint de transaminases, l'étude a été réalisée dans le sens 1 en remplaçant dans ce milieu réactionnel l'acide α-cétoglutarique et l'acide aminé par des quantités égales d'acide glutamique et de l'acide cétonique dont on veut étudier le comportement, puis on dose l'acide aminé engendré par la réaction enzymatique.

L'estimation semi-quantitative des activités transaminasiques présentes dans les galles de Neuroterus quercusbaccarum et de Biorhiza pallida a été effectuée par caractérisation chromatographique (papier Whatman N° 40 ; solvant phénol, eau) des acides aminés provenant des transaminations entre l'acide glutamique et différents acides cétoniques sous l'influence de suspensions enzymatiques préparées comme dans le cas des feuilles.

b.- Transaminases des acides aminés aromatiques

Les enzymes étudiées catalysent les réactions :

$$\text{ac. glutamique} + \text{ac. phénylpyruvique} \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} \text{phénylalanine} + \text{ac. α-cétoglutarique}$$

$$\text{ac. glutamique} + \text{ac. p.hydroxyphénylpyruvique} \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} \text{tyrosine} + \text{ac. α-cétoglutarique}$$

Ces deux activités enzymatiques sont le plus souvent étudiées dans le sens 2, et le dosage des acides cétoniques en milieu alcalin constitue la méthode la plus simple de détermination de l'activité de ces deux transaminases. Cette méthode n'a pas été applicable dans le cas du matériel étudié, la présence de substances polyphénoliques rendant impossibles, pour des extraits bruts ou peu purifiés, les lectures en milieu alcalin à 320 nm. J'ai donc déterminé les activités enzymatiques en dosant la tyrosine ou la phénylalanine formées. Cette méthode d'analyse offre de plus l'avantage d'étudier la réaction dans le sens métabolique de la formation des acides aminés. Le milieu réactionnel présente la composition indiquée dans le tableau XLVIII.

TABLEAU XLVIII

Composition du milieu réactionnel pour l'étude de la glutamate-phénylpyruvate transaminase

	E	T_1	T_2
Solution enzymatique	2 ml	0	0
Solution enzymatique portée 30 mn à 100° C	0	2 ml	0
Tampon pyrophosphate de Na 0,1 M pH 8,5	0,5 ml	0,5 ml	2,5 ml
Phénylpyruvate de sodium 50 µM/ml	1 ml	1 ml	1 ml
Ac. glutamique 50 µM/ml	1 ml	1 ml	1 ml
Pyridoxal phosphate 2,5 µM/ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Toluène	1 gtte	1 gtte	1 gtte

Après 4 heures d'action à 30° C, on acidifie le milieu par de l'acide chlorhydrique 5 N, on évapore à sec sous pression réduite et on reprend par 3 ml de tampon citrate de pH 2,2*. On dépose ensuite une fraction aliquote, en général 2 ml, au sommet d'une colonne de résine cationique "Spinco 50 A" (15 x 0,9 cm) thermostatée à 50° C ; l'acide glutamique résiduel est élué par 35 ml de tampon citrate de pH 3,25*. On relie ensuite le bas de la colonne au système d'analyse d'un "Amino acid Analyzer Beckman" et on élue la phénylalanine ou la tyrosine formées par du tampon de pH 4,25*. Le dosage de la phénylalanine en présence de tyrosine et celui des autres acides aminés ont été effectués selon le protocole normal d'utilisation de l'appareil.

Les témoins T_1 et T_2 ne conduisent qu'à la formation de traces de phénylalanine.

* Les tampons possèdent la composition indiquée dans la notice technique fournie avec l'appareil "Amino Acid analyzer Beckman".

Définitions

Une unité d'enzyme correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la formation de 1 µM de phénylalanine par minute dans mes conditions expérimentales.

L'activité spécifique est le nombre de milliunités (mU) d'enzyme par mg de protéines.

c.- Glutamique-oxalacétique transaminase

Cette enzyme catalyse la réaction :

$$\text{ac. glutamique} + \text{ac. oxalacétique} \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} \text{ac. aspartique} + \text{ac. } \alpha\text{-cétoglutarique}$$

Pour la détermination de l'activité enzymatique, j'ai retenu la méthode de GREEN et al. (1945) basée sur la détermination spectrophotométrique à 280 nm de l'acide oxalacétique formé.

Les essais enzymatiques sont réalisés directement dans les cuves du spectrophotomètre après un temps préalable d'équilibration à 30° C. Dans des tubes à essais on pipette successivement :

	Essai	Témoin
Solution enzymatique	2 ml	0
Tampon phosphate 0,1 M pH 7,5	0,5 ml	0,5 ml
Ac. aspartique 75 µM/ml dans le tampon de pH 7,5	1 ml	1 ml
Pyridoxal phosphate 2,5 µM/ml	0,5 ml	0,5 ml
On laisse équilibrer 10 mn dans un bain-marie à 30° C et on ajoute :		
Ac. α-cétoglutarique 75 µM/ml dans le tampon de pH 7,5	1 ml	1 ml

Après l'addition de l'acide α-cétoglutarique, on transvase le milieu enzymatique dans les cuves thermostatées à 30° C d'un spectrophotomètre "Jobin et Yvon". Les lectures à 280 nm s'effectuent au temps To et en général après 15 mn d'action (T + 15) en prenant le témoin pour "à blanc". L'augmentation de la densité optique due à la formation de l'acide oxalacétique est égale à :

D.O. oxalacétique = (D.O. au temps T + 15) - (D.O. au temps To)

et la quantité du produit formé s'obtient en utilisant un coefficient d'absorption moléculaire ε égal à 529 à pH 7,5. ELLIS et DAVIES (1961) indiquent une valeur de 518 à pH 7,0.

d.- Glutamique-pyruvique transaminase

Cette enzyme catalyse la réaction :

$$\text{ac. glutamique} + \text{ac. pyruvique} \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} \text{alanine} + \text{ac. } \alpha\text{-cétoglutarique}$$

Pour les dosages en série, la réaction enzymatique a été suivie dans le sens 2 par détermination, selon la méthode de STRAUB (1936) modifiée par GREEN et al. (1945), de l'acide pyruvique formé. Cette méthode fait intervenir la condensation en milieu fortement alcalin de l'acide pyruvique avec l'aldéhyde salicylique pour former un produit coloré présentant un maximum d'absorption à 440 nm. Dans ces conditions, ni l'acide oxalacétique, ni l'acide α-cétoglutarique n'interviennent dans le dosage.

La composition du milieu enzymatique est indiquée dans le tableau IL.

TABLEAU IL

Composition du milieu pour l'étude de la glutamate-pyruvate transaminase

	Essai	Témoin
Solution enzymatique	1 ml	1 ml
Pyridoxal phosphate 2,5 µM/ml	0,1 ml	0,1 ml
Alanine 75 µM/ml	0,2 ml	0,2 ml
Ac. α-cétoglutarique 75 µM/ml	0,2 ml	0,2 ml
Temps de séjour à 30° C	4 heures	0

Après 4 heures d'action à 30° C, on ajoute 1 ml d'une solution aqueuse renfermant 100 g de potasse pour 60 ml d'eau puis 0,5 ml d'une solution alcoolique à 2 % (alcool à 96° G.L.) d'aldéhyde salicylique. On laisse la réaction colorée se développer 10 mn à 38 ° C puis on ajoute 20 ml d'eau distillée et on effectue les lectures à 440 nm contre le témoin.

Au cours des essais préliminaires, j'ai constaté une influence de la composition du milieu enzymatique sur l'intensité de la réaction colorée. Pour réduire cet effet, le témoin comprend tous les constituants du milieu réactionnel, mais dans ce cas l'addition de la potasse s'effectue immédiatement après celle de l'acide α-cétoglutarique. La quantité d'acide pyruvique engendrée est déduite d'une courbe d'étalonnage établie selon le mode opératoire ci-dessus.

B.- LA TRANSAMINASE DES ACIDES AMINES AROMATIQUES CHEZ LE CHENE ET SES GALLES

I.- IMPORTANCE RELATIVE DES ACTIVITES TRANSAMINASIQUES DANS LES FEUILLES DE Q. pedunculata ET DANS LES GALLES DE Neuroterus quercusbaccarum ET DE Biorhiza pallida

La préparation enzymatique des feuilles de Chêne présente des activités transaminasiques multiples (figure 33) puisqu'elle peut synthétiser l'acide glutamique et l'alanine à partir des acides cétoniques correspondant et de tous les acides aminés essayés. Néanmoins, l'examen de cette figure montre que les vitesses des transaminations diffèrent considérablement selon l'acide aminé étudié.

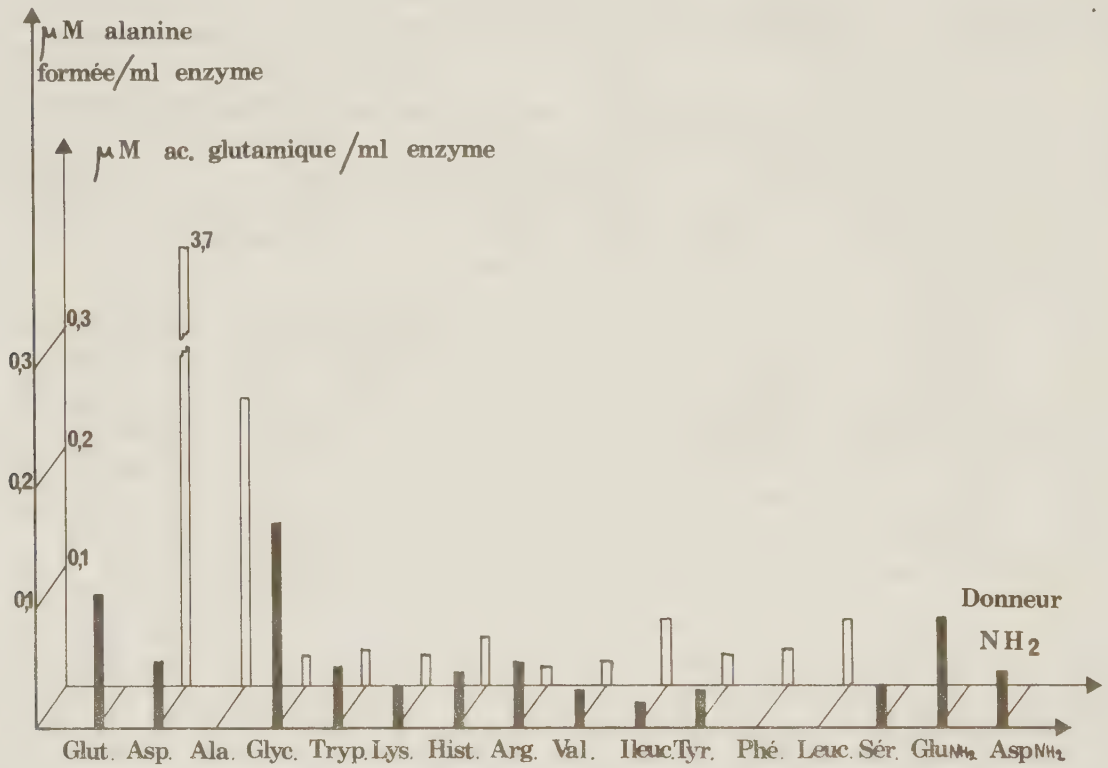


Figure 33

Transaminations entre les acides α-cétoglutarique et pyruvique et différents acides aminés et amides. Résultats exprimés en µM d'acide glutamique ou d'alanine formés en 4 heures par ml de suspension enzymatique

La glutamate-oxalacétate transaminase constitue l'enzyme nettement la plus abondante dans le Chêne (figure 33). En effet, la formation d'acide glutamique à partir d'acide aspartique est environ 70 à 100 fois plus rapide que dans le cas de la plupart des autres acides aminés. La glutamique-pyruvique transaminase présente également une activité notable mais les autres transaminations observées sont très faibles, puisque dans les conditions expérimentales retenues la majorité des acides aminés ne permettent qu'une transformation de l'ordre de 0,1 % des substrats initialement présents. Ces résultats sont en accord avec les dosages de WILSON et al. (1954)

qui ont montré que les glutamate-oxalacétate et glutamate-pyruvate transaminases constituent les aminotransférases les plus actives chez le Blé, l'Orge et le Lupin. Ces auteurs ont aussi détecté des réactions de transamination entre l'acide α-cétoglutarique et de nombreux autres acides aminés, mais ils notent que le plus souvent l'intensité de ces réactions demeure faible.

Pour les transaminations avec l'acide pyruvique, il n'existe pas d'activité enzymatique très importante (figure 33). La réaction maximale est observée dans le cas du glycocolle ; l'acide glutamique présente une activité notable ce qui confirme la présence de la glutamique-pyruvique transaminase toutefois la vitesse de la transamination est plus faible que lorsque l'enzyme catalyse la formation d'acide glutamique (figure 33).

Dans les galles (tableau L) les glutamique-oxalacétique et glutamique-pyruvique aminotransférases constituent aussi, et très nettement, les enzymes les plus actives.

TABLEAU L

Estimation semi-quantitative des acides aminés formés par transamination entre l'acide glutamique et quelques acides cétoniques sous l'influence de préparations enzymatiques de galles de Neuroterus quercusbaccarum et de Biorhiza pallida

Nature des acides cétoniques	Acides aminés recherchés	Quantités formées	
		G. Neuroterus	G. Biorhiza
Ac. oxalacétique	Ac. aspartique	+++	+++
Ac. pyruvique	Alanine	++	++
Ac. phénylpyruvique	Phénylalanine	+	+
Ac. p.hydroxyphénylpyruvique	Tyrosine	+	+

Par convention, +++ désigne une transamination active et + une activité enzymatique détectable mais faible.

Ces déterminations ont également permis de mettre en évidence les transaminases des acides aminés aromatiques, mais la figure 33 et le tableau L montrent qu'elles possèdent des activités faibles, et en particulier très nettement inférieures à celle de la glutamique-oxalacétique transaminase. L'existence d'activités enzymatiques si peu intenses pour catalyser l'une des réactions essentielles à la biosynthèse de la tyrosine et de la phénylalanine m'a incité à vérifier, in vivo, le rôle des acides cétoniques aromatiques dans l'élaboration de ces acides aminés.

II.- FORMATION DE TYROSINE ET DE PHENYLALANINE A PARTIR DES ACIDES p.HYDROXYPHENYLPYRUVIQUE ET PHENYLPYRUVIQUE

On fait absorber à des tiges feuillées de Chêne, 10 µM de l'un des acides cétoniques aromatiques en solution dans 800 µl de tampon phosphate de pH 7,5 M/200. L'absorption dure 5 heures, et on laisse métaboliser une heure supplémentaire. On fixe les plantes à l'azote liquide, on lyophilise, puis on extrait et on dose selon le protocole habituel.

Comme le montre le tableau LI, les acides phénylpyruvique et p.hydroxyphénylpyruvique constituent de bons précurseurs, respectivement de la phénylalanine et de la tyrosine.

TABLEAU LI

Influence des acides phénylpyruvique et p.hydroxyphénylpyruvique sur les teneurs en tyrosine et phénylalanine des feuilles de Q. pedunculata. Résultats exprimés en µM/g de matière sèche

Acides aminés	Témoins	Après absorption	
		d'acide phénylpyruvique	d'acide p.hydroxyphénylpyruvique
Phénylalanine	0,17	5,54	0,10
Tyrosine	0,07	0,40	0,56

L'acide p.hydroxyphénylpyruvique n'influence pas les teneurs en phénylalanine. Par contre, une incorporation d'acide phénylpyruvique conduit à une augmentation sensible de la tyrosine.

Il existe donc dans la plante des rapports entre les voies de biosynthèse de la phénylalanine et de la tyrosine, ou entre les acides aminés eux-mêmes, mais uniquement dans le sens :

composés non hydroxylés ⟶ composés hydroxylés

Un retour par l'acide préphénique paraît à exclure et il est plus vraisemblable d'envisager une hydroxylation qui pourrait s'effectuer soit :

- au niveau de la phénylalanine
- au niveau des acides cétoniques aromatiques.

La première hypothèse semblait la plus plausible à la suite de la mise en évidence par NAIR et VINING (1965) de la phénylalanine hydroxylase chez l'Epinard. Toutefois, dans le cas du Chêne, des incorporations de phénylalanine ^{14}C à des plantules n'ont jamais permis de mettre en évidence de la tyrosine marquée ; l'accroissement des teneurs en cet acide aminé ne semble donc pas provenir d'une hydroxylation directe de la phénylalanine

La validité de la seconde hypothèse n'a pas été vérifiée au cours de ce travail. Elle fera l'objet d'une étude ultérieure, car on ne connait pas à l'heure actuelle l'existence d'hydroxylases des acides cétoniques aromatiques chez les végétaux.

En conclusion, malgré la faible intensité des réactions de transamination, l'intervention des acides cétoniques aromatiques dans la biosynthèse de la tyrosine et de la phénylalanine constitue une réalité physiologique. J'ai donc tenté d'approfondir les mécanismes de cette réaction par l'étude in vitro des enzymes catalysant l'amination de ces acides cétoniques aromatiques.

III.- REPARTITION DANS LA PLANTE ET EVOLUTION DE LA GLUTAMIQUE-PHENYLPYRUVIQUE TRANSAMINASE AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE Q. pedunculata

Pour cette étude, j'ai retenu les quatre stades de développement suivants :

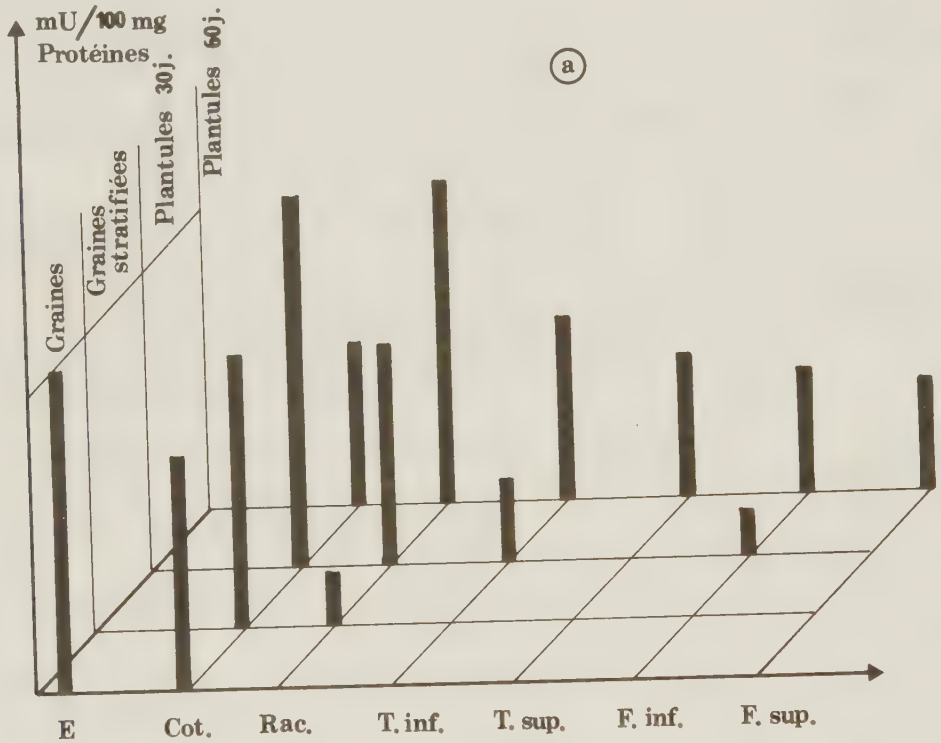
- graines au repos (stade I),
- graines stratifiées, développement de la racine : environ 4 cm (stade II),
- plantes âgées d'un mois, présentant une seule rosette de feuilles (stade III),
- plantes âgées de deux mois possédant deux rosettes de feuilles. Dans ce cas, j'ai analysé séparément les parties de la tige situées de part et d'autre de la première rosette de feuilles (T. inf. et T. sup.) ainsi que les feuilles de la rosette inférieure et supérieure (F. inf. et F. sup.) (stade IV).

Les dosages ont été effectués sur une suspension enzymatique préparée comme pour la mise en évidence des transaminases du Chêne.

A tous les stades de développement examinés, la phénylalanine transaminase est présente dans les différents organes de la plante (figure 34). Dans la graine au repos, l'enzyme constitue une fraction plus importante des protéines de "l'embryon" que de celles des cotylédons. Pour les plantes bien développées (1 ou 2 mois de culture) l'enzyme est particulièrement abondante dans les racines. Par rapport aux teneurs en protéines, les tiges renferment une plus grande quantité de transaminase que les feuilles (figure 34 a). Ce résultat est dû aux quantités plus faibles de protéines contenues dans les tiges ; en effet, les feuilles contiennent souvent plus d'enzyme, par unité de masse sèche, que les tiges.

Au cours du développement de la plante la quantité d'enzyme reste sensiblement constante dans les cotylédons durant le premier mois de culture (figure 34 b), puis elle diminue très nettement. Par contre, rapportées aux protéines, les activités augmentent au cours des premières phases du développement (figure 34 a) mettant ainsi en évidence la stabilité de l'enzyme pendant l'utilisation des autres protéines du cotylédon. Pour les racines ou les parties aériennes, la croissance s'accompagne d'une augmentation de la quantité de transaminase présente dans chaque organe (figure 34 b). Cet accroissement surtout sensible dans le cas des racines ne résulte pas uniquement de l'augmentation de la masse de l'organe considéré, mais provient également d'une synthèse enzymatique accrue puisque dans tous les cas, l'activité rapportée aux protéines est plus élevée dans les organes âgés que dans les organes jeunes (figure 34 a).

Bien que les protéines foliaires soient moins riches en glutamique-phénylpyruvique transaminase que celles des autres organes (figure 34 a) j'ai cependant entrepris la purification de l'enzyme à partir des feuilles pour les mêmes raisons que celles énoncées lors de l'étude de la chorismate-mutase.



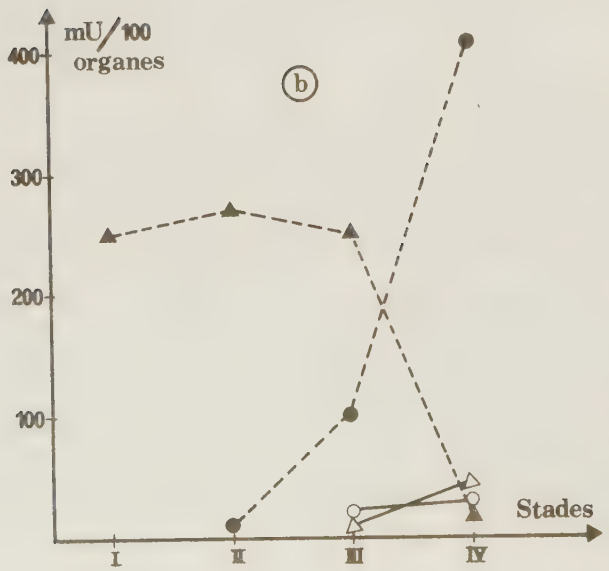


Figure 34

Evolution de la glutamique-phényl-pyruvique transaminase dans les différents organes de la plante au cours des premiers stades du développement.

Figure 34 a : Résultats rapportés à 100 mg de protéines

Figure 34 b : Résultats rapportés à 100 organes

cotylédons
racines
tiges
feuilles

IV.- PURIFICATION ET ETUDE DE LA TRANSAMINASE DES ACIDES AMINES AROMATIQUES

a.- Résultat de la purification

Le tableau LII résume les valeurs obtenues dans le cas de la meilleure purification. L'activité spécifique finale est de 108, ce qui correspond à un taux de purification de 180. Pour d'autres purifications effectuées selon ce protocole, j'ai obtenu des solutions enzymatiques possédant des activités spécifiques plus faibles mais qui restent cependant toujours supérieures ou égales à 80.

TABLEAU LII

Exemple de purification de la glutamate-phénylpyruvate transaminase

Etapes de purification	Vol. en ml	Act.enz. en mU	Prot. mg	% act. init.	Act. spéc.	Taux de purification
Extrait brut	95	109,3	181,90	100	0,6	1,0
Séphadex G 50	160	441,3	70,00	403	6,3	10,5
Séphadex G 200	220	389,4	13,10	356	29,7	49,5
DEAE-cellulose	100	114,2	1,06	104	108,0	180,0

L'examen de ce tableau fait apparaître une augmentation très importante de l'activité de l'extrait après passage sur la colonne de Séphadex G 50 ; cet accroissement est sans doute dû à la séparation sur le filtre moléculaire de la protéine enzymatique et des substances inhibitrices de faibles poids moléculaires (tannins, polyphénols, acides cétoniques,...). Je reviendrai sur cet aspect inhabituel des purifications enzymatiques au cours de l'étude des inhibiteurs de l'enzyme. Cette augmentation permet d'obtenir dans l'extrait purifié une activité enzymatique supérieure à celle de l'extrait brut.

RED'KINA et al. (1969) ont également constaté un accroissement de l'activité de l'enzyme du Pois après dialyse, mais cette augmentation demeure limitée (42 %) et au stade final de la purification ces auteurs ne retrouvent plus que 3 % de l'activité initiale.

b.- Influence du pH

Dans le tampon pyrophosphate 0,1 M, le maximum d'activité se situe à pH 8,5 (figure 35) valeur très voisine de celle trouvée par SCANDURRA et al. (1967) pour la glutamate-phénylpyruvate transaminase du rein de boeuf (pH optimum 8,35) et par USPENKAJA et al. (1964) pour l'enzyme du Pois (pH optimum 8,4). Les transaminases animales et végétales faisant intervenir l'acide phénylpyruvique présentent donc peu de variations dans la valeur de leur pH optimum d'action. Mais ce dernier diffère significativement de celui des tyrosine-aminotransférases animales dont l'activité maximale se situe vers pH 7,5 (KENNEY, 1959 ; HAYASHI et al., 1967).

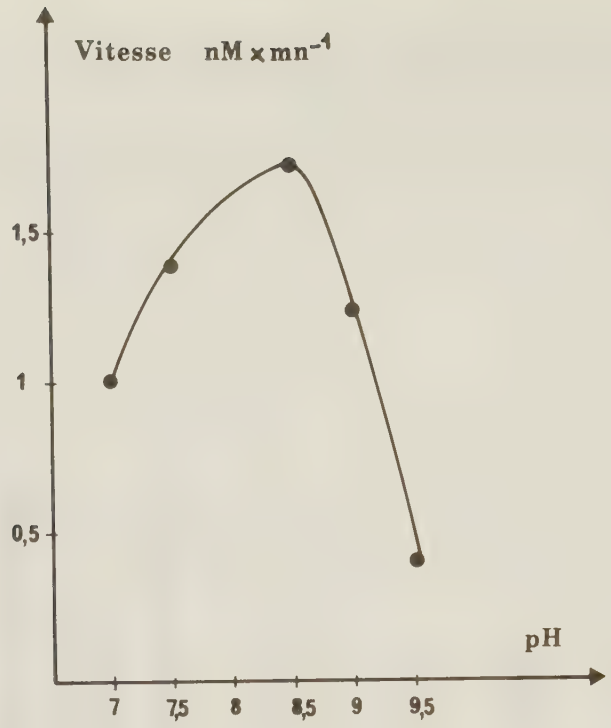


Figure 35

Influence du pH sur l'activité enzymatique. Tampon pyrophosphate 0,1 M. Activité spécifique de l'enzyme 12. Stade de purification : après hydroxylapatite

c.- Influence de la concentration en substrats

Les transaminations sont des réactions à deux substrats mettant en jeu de nombreux complexes intermédiaires, et une détermination exacte des constantes de MICHAELIS nécessite l'étude de l'influence de la concentration de chaque substrat sur la vitesse de la réaction enzymatique pour des concentrations variables des autres substrats (VELICK et VAVRA, 1962 ; DAVIES et ELLIS, 1961).

Dans ce travail, je me suis limité à l'étude de l'influence de la concentration en l'un des substrats sur la vitesse de la réaction, pour une concentration saturante de l'autre substrat. De plus, j'ai étudié la transamination de l'acide p.hydroxyphénylpyruvique qui constitue également un substrat pour l'enzyme (GAMBORG et WETTER, 1963). Les résultats obtenus ont permis de tracer les courbes de la figure 36 et de calculer les constantes apparentes de MICHEALIS selon le mode de représentation graphique de LINEWEAVER et BURK (1934) :

Substrats	Valeurs de $K_{m\ app.}$
Ac. glutamique	$1,8 \times 10^{-3}$ M
Ac. phénylpyruvique	$8,0 \times 10^{-3}$ M
Ac. p. hydroxyphénylpyruvique	$3,5 \times 10^{-3}$ M

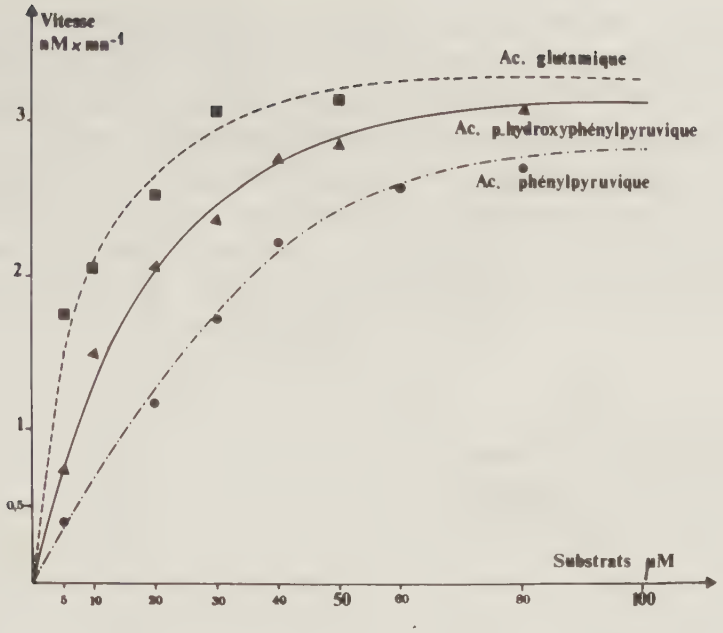


Figure 36

Influence de la concentration en substrats sur la vitesse de la réaction enzymatique. Stade de purification : après DEAE-cellulose. Activité spécifique : 108. Concentration du substrat maintenu constant : 2 x 10^{-2} M (100 µM dans le milieu réactionnel). L'influence de l'acide glutamique a été déterminée en présence d'acide phénylpyruvique

Ces valeurs sont en accord avec les résultats obtenus par RED'KINA et al. (1969) pour la glutamate-phénylpyruvate transaminase du Pois, qui possède pour ses deux substrats les constantes suivantes :

Ac. glutamique	3,3 x 10^{-3} M
Ac. phénylpyruvique	7,5 x 10^{-3} M

Malgré l'origine différente de ces deux enzymes, on observe les $K_{m\ app.}$ les plus faibles pour l'acide glutamique ; la transaminase présente donc plus d'affinité pour l'acide aminé que pour les acides cétoniques. Parmi ces derniers, l'acide p.hydroxyphénylpyruvique est plus facilement transaminé que l'acide phénylpyruvique. Cette plus grande affinité pour le composé hydroxylé est à rapprocher des résultats de GAMBORG et WETTER (1963) qui constatent que la tyrosine est un meilleur substrat pour la transaminase de Phaseolus aureus que la phénylalanine.

d.- Influence de la concentration en enzyme et du temps

Le comportement des différentes glutamate-phénylpyruvate aminotransférases vis-à-vis du temps d'action et de la concentration en enzyme est variable et dépend généralement de l'origine de la préparation enzymatique. La transaminase extraite du foie de chien ne possède une vitesse d'action proportionnelle à la concentration en enzyme que pour les faibles teneurs en protéines (CANELLAKIS et COHEN, 1956).

L'enzyme du Pois présente une activité qui varie linéairement en fonction de la concentration en enzyme mais par contre, son activité n'est pas proportionnelle au temps (RED'KINA et al., 1969) enfin, dans le cas de l'enzyme de Phaseolus aureus (GAMBORG et WETTER, 1963) la linéarité est respectée dans les deux cas.

Pour la transaminase du Chêne (figure 37), la vitesse de la réaction n'est proportionnelle à la concentration en enzyme que pour des faibles teneurs en catalyseur. Les vitesses pour les quantités plus élevées sont inférieures à celles prévisibles par l'extrapolation des valeurs correspondant aux faibles concentrations en enzyme.

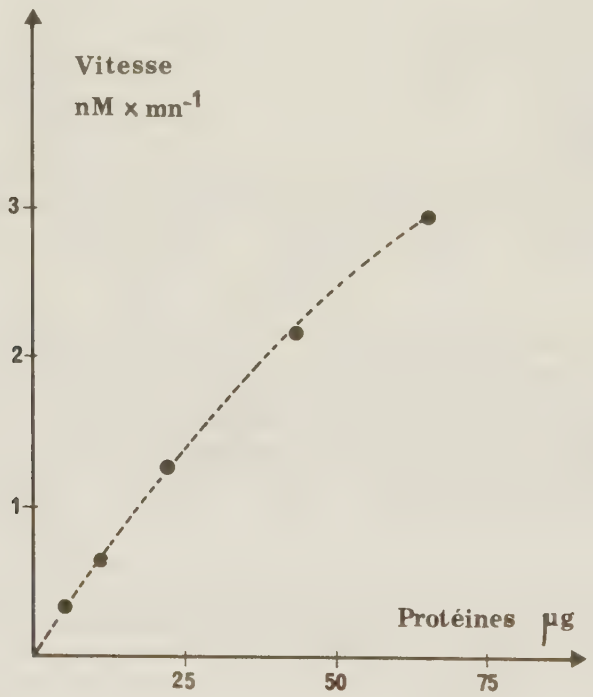


Figure 37

Vitesse de la transamination en fonction de la concentration en enzyme. Activité spécifique : 56. Stade de purification : après DEAE-cellulose

Ce comportement a déjà été observé pour d'autres aminotransférases (CANELLAKIS et COHEN, 1956 ; DAVIES et ELLIS, 1961) et l'explication la plus souvent avancée est celle de la présence d'un inhibiteur dans la préparation enzymatique. Dans cette étude, les dosages ont été réalisés sur une solution enzymatique purifiée et il semble donc que cette hypothèse soit à écarter. Une explication sans doute plus satisfaisante, est fournie au cours de cette étude, par la mise en évidence du rôle inhibiteur de l'acide α-cétoglutarique (tableau LIX, page 164), l'un des produits de la réaction enzymatique.

L'absence de linéarité observée pour de fortes concentrations en enzyme résulterait de l'accumulation de cet acide cétonique dans le milieu réactionnel. De plus, on peut émettre l'hypothèse que les contradictions observées dans la littérature

proviennent des activités très différentes des enzymes étudiées, conduisant ainsi à la formation de quantités variables (en fonction du temps, ou de la concentration en enzyme) du composé inhibiteur (acide α-cétoglutarique).

Pour une concentration faible en enzyme, et dans les conditions expérimentales retenues, la réaction est directement proportionnelle au temps d'action (figure 38).

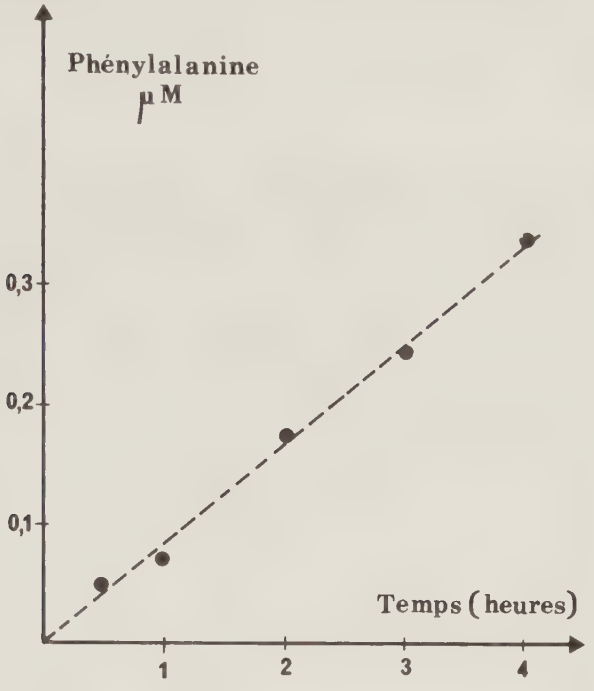


Figure 38

Influence du temps sur la formation de phénylalanine. Même préparation enzymatique que pour la figure 35

e.- Influence du pyridoxal-phosphate

Les aminotransférases diffèrent de façon significative par la fermeté avec laquelle le pyridoxal-phosphate est lié à l'apoenzyme (GUIRARD et SNELL, 1964) ; toutefois on observe généralement une perte partielle du coenzyme au cours des opérations de purification (DAVIES et ELLIS, 1961 ; HAYASHI et al., 1967). Dans le cas des transaminases faisant intervenir l'acide phénylpyruvique, les données de la littérature deviennent contradictoires. Ainsi, ni l'activité de la transaminase purifiée de Phaseolus aureus (GAMBORG et WETTER, 1963), ni celle d'un extrait dialysé de germe de Blé (USPENKAJA et al., 1965) ne sont accrues par un apport de pyridoxal-phosphate. Par contre, son addition au milieu enzymatique augmente l'activité des transaminases extraites du rein de boeuf (SCANDURRA et al., 1967) et des graines de Pois (USPENKAJA et al., 1965) ; la stimulation la plus importante est obtenue pour l'enzyme végétale, dont l'activité est triplée en présence du cofacteur.

Pour mesurer l'effet du pyridoxal-phosphate sur la transférase de Quercus pedunculata, j'ai utilisé une préparation enzymatique très purifiée. On cons-

constate (tableau LIII) que le cofacteur exerce une stimulation très importante sur l'activité de la transaminase. L'effet maximum correspond à l'addition de 1,25 µM au milieu réactionnel et dans ces conditions l'activité de l'enzyme est égale à 2 fois 1/2 celle du témoin. Les activités mesurées pour des quantités de cofacteur plus importantes sont nettement inférieures à ces valeurs et aucune explication satisfaisante ne peut être fournie à ce phénomène. Enfin, en absence de pyridoxal-phosphate exogène, l'enzyme conserve une activité non négligeable ; la dissociation de l'enzyme au cours des opérations de purification n'est donc que partielle.

TABLEAU LIII

Influence du pyridoxal-phosphate sur la glutamate-phénylpyruvate transaminase. Stade de purification:après DEAE-cellulose. Activité spécifique : 83. L'introduction des autres constituants dans le milieu enzymatique s'effectue dès l'addition du cofacteur à la solution enzymatique

µM de pyridoxal-phosphate ajouté	Phénylalanine formée en nM x mn^{-1}	Stimulation en % du témoin
0	0,30	0
0,5	0,73	243
1,25	0,78	260
2,5	0,44	147
7,5	0,37	123

L'enzyme de Quercus pedunculata présente donc une affinité pour son coenzyme très comparable à celle de la glutamate-phénylpyruvate transaminase du Pois (USPENKAJA et al., 1965) :

- les deux enzymes conservent une activité non négligeable en absence de cofacteur exogène
- elles sont fortement stimulées (activités multipliées par 2 ou 3) par un apport de pyridoxal-phosphate dans le milieu enzymatique.

De ce point de vue, ces deux enzymes diffèrent nettement de la transaminase de Phaseolus aureus, qui même purifiée ne présente aucune exigence pour le pyridoxal-phosphate.

f.- Réversibilité de la réaction

Les transaminases constituent une des rares classes d'enzymes dont l'action est facilement réversible, mais en général les vitesses des transaminations diffèrent considérablement selon le sens d'étude choisi et selon la nature et l'origine de l'enzyme étudiée.

La réversibilité de la glutamate-phénylpyruvate transaminase du Chêne a été étudiée à deux valeurs du pH (7,5 et 8,5) pour tenir compte d'une constatation de LATCHÉ (1963) qui a montré que selon le pH d'étude, les glutamate-oxalacétate et glutamate-pyruvate transaminases de Agaricus hortensis catalysent préférentiellement

soit la synthèse d'acide glutamique (pH 8,5), soit celle de l'acide aspartique ou de l'alanine (pH 7,5).

Pour les deux valeurs du pH retenues (tableau LIV), l'enzyme de Quercus pedunculata catalyse plus rapidement le transfert du groupement amino de l'acide glutamique vers l'acide phénylpyruvique que de la phénylalanine vers l'acide α-cétoglutarique. Les vitesses relatives des transaminations sont indépendantes du pH et, dans les deux cas la formation de phénylalanine est environ 3 fois plus rapide que celle de l'acide glutamique.

TABLEAU LIV

Réversibilité de la réaction catalysée par la glutamate-phénylpyruvate transaminase. Stade de purification : après DEAE-cellulose. Activité spécifique : 83. Concentration en substrats : 10^{-2} M

Valeurs du pH	Substrats aminés	Substrats cétoniques	Acides aminés formés en nM x mn^{-1} : Phénylalanine	Acides aminés formés en nM x mn^{-1} : Ac. glutamique	Rapport phe / glu
7,5	Ac. glutamique	Ac. phénylpyruvique	0,279	-	3,4
	Phénylalanine	Ac. α-cétoglutarique	-	0,083	
8,5	Ac. glutamique	Ac. phénylpyruvique	0,442	-	3,5
	Phénylalanine	Ac. α-cétoglutarique	-	0,125	

Ce résultat confirme les données de USPENKAJA et al. (1965) et montre que les transaminases végétales favorisent la formation des acides aminés aromatiques à partir de leurs acides cétoniques et de l'acide glutamique. Cette propriété les distingue très nettement des aminotransférases animales. Les réactions catalysées par ces dernières sont en effet en faveur du transfert du groupement amino de l'acide aminé aromatique vers l'acide α-cétoglutarique avec formation des acides cétoniques aromatiques (CANELLAKIS et COHEN, 1956 ; KENNEY, 1959 ; FONNUM et al., 1964). Cette différence dans les vitesses relatives des réactions catalysées par les transaminases animales et végétales est en relation avec leurs rôles métaboliques.

Chez les végétaux, en catalysant l'amination des acides cétoniques, elles jouent un rôle biosynthétique primordial dans l'élaboration des acides aminés aromatiques.

Pour les animaux, la tyrosine ou la phénylalanine constituent des acides aminés essentiels. Les transaminases ne jouent donc pas un rôle biosynthétique mais interviennent au contraire, dans le catabolisme des acides aminés aromatiques. Ainsi, la tyrosine-aminotransférase permet de synthétiser l'acide p.hydroxyphénylpyruvique, intermédiaire dans la formation de l'acide homogentisique (CANELLAKIS et COHEN, 1956 ; DALY, 1967).

g.- Action de la température

Sur l'activité enzymatique.- Pour étudier l'influence de la température sur l'activité enzymatique le temps d'action a été ramené à une heure. Dans ces conditions, l'enzyme manifeste un maximum d'activité net à 40° C (Q_{10} = 2,1) (figure 39).

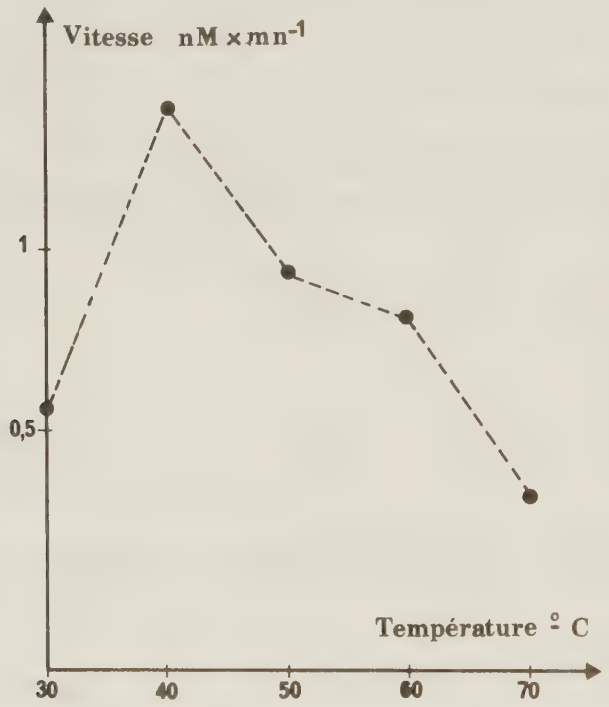


Figure 39

Influence de la température sur l'activité enzymatique. Durée de l'essai:une heure. Même préparation enzymatique que pour la figure 35

La glutamate-phénylpyruvate transaminase purifiée par RED'KINA et al. (1969) à partir du Pois, possède une activité maximale pour une température très voisine (37° C). Par contre, pour la transaminase aromatique de Phaseolus aureus, la température optimale est supérieure à 50° C mais il est vrai, que dans ce cas, le temps d'action n'est que de 15 minutes ce qui réduit considérablement la dénaturation thermique.

Sur la stabilité de l'enzyme.- La glutamique-phénylpyruvique transaminase est sensible à la dénaturation thermique (figure 40) et un séjour de 30 mn à 60° C provoque une diminution de 82 % de l'activité observée à 30° C.

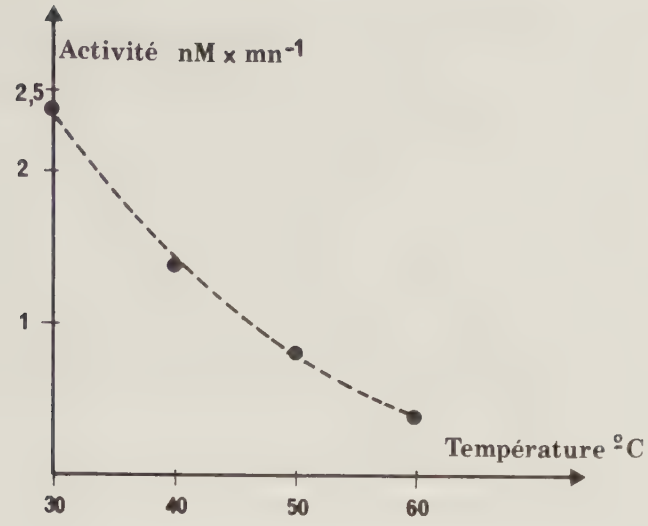


Figure 40

Influence de la température sur la stabilité de l'enzyme

On porte 30 minutes à des températures variables 2 ml de la solution enzymatique (stade de purification après DEAE-cellulose), on refroidit dans un bain eau-glace puis on effectue la mesure de l'activité enzymatique.

Il est cependant intéressant de noter la persistance d'une activité enzymatique à cette température, ce qui rapproche cette enzyme de la phénylalanine transaminase de E. coli, qui présente encore dans ces conditions 30 % de son activité initiale alors que la tyrosine-aminotransférase est entièrement dénaturée (SILBERT et al., 1963).

Pour les transaminases de E. coli (SILBERT et al., 1963) et du foie de rat (HAYASHI et al., 1967), l'acide α-cétoglutarique et le pyridoxal-phosphate assurent une protection efficace contre l'inactivation thermique. Au contraire, chez le Chêne (tableau LV), ni le cofacteur, ni aucun des substrats de la réaction ne possèdent un effet protecteur marqué contre la dénaturation de l'enzyme portée 15 mn à la température de 60° C.

TABLEAU LV

Influence du cofacteur et des substrats sur la dénaturation thermique de l'enzyme

Nature de l'essai	Phénylalanine formée nM x mn^{-1}
Enzyme seule	1,50
Enzyme + 50 µM ac. glutamique	1,35
Enzyme + 50 µM ac. phénylpyruvique	1,70
Enzyme + 1,25 µM pyridoxal-phosphate	1,15

h.- Influence des inhibiteurs

Les antioxydants les plus fréquemment utilisés pour éviter un brunissement excessif des extraits enzymatiques (ANDERSON et ROWAN, 1967) possèdent un pouvoir inhibiteur très prononcé (tableau LVI).

TABLEAU LVI

Influence des inhibiteurs sur l'activité enzymatique

A 1 ml de l'extrait enzymatique (stade de purification : après DEAE-cellulose, activité spécifique 108) on ajoute 1 ml d'une solution de l'inhibiteur à la concentration M/100 (1 % dans le cas des tannins et du polyéthylène glycol) dans le tampon pyrophosphate de pH 8,5. On laisse en contact une heure et on effectue l'essai enzymatique selon le protocole habituel.

Nature de l'inhibiteur	% d'inhibition	Nombre de OH phénoliques
Antioxydant		
Thioglycolate de sodium	57	0
Thiosulfate de sodium	59	0
Métabisulfite de K	100	0
Acides phénoliques		
Série cinnamique		
Acide cinnamique	0	0
Acide p.coumarique	19	1
Acide o.coumarique	11	1
Acide caféique	66	2
Série benzoïque		
Acide p.hydroxybenzoïque	18	1
Acide salicylique	30	1
Acide vanillique	18	1 + OCH_3
Acide protocatéchique	23	2
Acide gentisique	37	2
Acide gallique	50	3
Depside		
Acide chlorogénique	39	2
Tannins		
Tannins hydrolysables (N.B.C)	100	+++
Tannins de Quercus sessilis	92	+++
Acides organiques		
Acide shikimique	21	0
Acide malique	67	0
Acide citrique	57	0
Divers		
Polyéthylène glycol	54	0

Le métabisulfite provoque une inhibition totale de l'enzyme ; cette inhibition n'est que partiellement levée par élimination de l'agent réducteur sur Séphadex G 50. Le métabisulfite entraîne donc des modifications irréversibles de la protéine et son emploi comme antioxydant pour l'extraction des protéines enzymatiques n'est pas valable dans tous les cas. Le thiosulfate et le thioglycolate de sodium réduisent l'activité enzymatique d'environ 50 %. On peut penser que l'action de ces composés s'exerce sur le groupement aldéhydique du pyridoxal-phosphate. Ainsi dans le cas du thioglycolate la valeur alcaline du pH permet d'envisager la formation d'un semi-mercaptal entre ce groupement et la fonction -SH du réducteur (GADAL et SERIS, 1962). On peut également envisager une action par rupture des ponts S-S dans la protéine ; on sait, en effet, que la cystine peut se transformer en cystéine sous l'action du sulfite de sodium.

Les acides phénoliques des séries benzoïque ou cinnamique diffèrent peu dans l'intensité de leur action mais on observe une certaine relation entre le degré de l'inhibition et le nombre d'hydroxyles situés sur le noyau benzénique :

- l'acide cinnamique, substance non hydroxylée ne possède aucun effet inhibiteur sur la réaction enzymatique
- les acides phénoliques pourvus d'un seul OH libre sont en général peu inhibiteurs et on ne constate pas de relation entre la position de l'hydroxyle et le pouvoir inhibiteur, l'efficacité des acides p.coumarique, o.coumarique et p.hydroxybenzoïque étant sensiblement identiques. L'acide vanillique qui possède un hydroxyle libre et un groupe méthoxyle se comporte comme un composé monohydroxylé
- enfin, les acides caféique, gentisique et gallique substances pourvues de deux ou trois hydroxyles se révèlent être les inhibiteurs les plus efficaces.

Toutefois, cette concordance entre le nombre d'hydroxyles et le pouvoir inhibiteur n'est pas toujours respectée, ainsi l'acide salicylique qui ne possède qu'un seul -OH en position ortho se révèle plus actif que l'acide protocatéchique pourtant dihydroxylé.

Contrairement aux résultats de GORTNER et KENT (1958) qui montrent que l'acide chlorogénique est un inhibiteur de l'IAA-oxydase trois fois plus actif que l'acide caféique, ce dernier à concentration équimoléculaire se révèle un répresseur de la transaminase plus efficace que le depside.

L'inhibition de l'enzyme par les acides phénoliques laissait prévoir une action importante des tannins. Effectivement, on constate un arrêt pratiquement total de l'activité enzymatique bien que le pH du milieu (pH 8,5) soit très éloigné de la valeur optimale de combinaison entre les protéines et les tannins (pH 5,0) (GADAL et BOUDET, 1965). On constate un pouvoir inhibiteur légèrement plus élevé pour les tannins hydrolysables que pour les tannins du Chêne (qui sont un mélange de tannins hydrolysables et de tannins condensés). Les raisons de cette différence peuvent être multiples : poids moléculaires différents, teneurs en acides phénoliques variables, taux d'oxydation,...

Les acides malique et citrique sont également de bons inhibiteurs et leur action est supérieure à celle de l'acide shikimique. Ce type d'inhibition a déjà été signalé par BRAUNSTEIN (1947) pour la glutamate-oxalacétate transaminase et ces acides carboxyliques pourraient, selon cet auteur, intervenir par suite de leur analogie de structure avec l'acide glutamique.

L'inhibition par le polyéthylène glycol agent précipitant des tannins, s'explique plus vraisemblablement par formation d'un complexe avec le phénylpyruvate que par une action directe sur la protéine enzymatique.

Un grand nombre des composés essayés dans cette étude et dont l'action se révèle inhibitrice sur la transaminase, se rencontrent en même temps que l'enzyme dans les feuilles de Chêne : tannins (BOUDET et GADAL, 1965), composés phénoliques (ALIBERT et al., 1969), acide organiques (MOILLO, 1968) ou sont introduits dans le milieu lors de l'extraction de l'enzyme (thioglycolate et polyéthylène glycol). L'élimination de l'ensemble de ces substances par filtration moléculaire sur la colonne de Séphadex G 50 fournit une explication sans doute satisfaisante à l'accroissement considérable de l'activité enzymatique constaté après ce stade de purification (tableau LII).

i.- Etude de la spécificité de l'enzyme

L'étude du mécanisme d'action de la glutamique-oxalacétique transaminase isolée du coeur de porc (VELICK et VAVRA, 1962 ; GUIRARD et SNELL, 1964) a permis de montrer que la transamination est la somme des deux demi-réactions :

ac. aminé I + enzyme-pyridoxal $\rightleftharpoons$ ac. cétonique I + enzyme-pyridoxamine

ac. cétonique II + enzyme-pyridoxamine $\rightleftharpoons$ ac. aminé II + enzyme-pyridoxal

Pour catalyser le transfert du groupement $-NH_2$ tout se passe donc comme s'il existait deux enzymes distinctes, l'une ayant pour substrat l'acide aminé I, l'autre l'acide cétonique II. Il faut de plus préciser que par suite de la réversibilité de cette réaction enzymatique, l'acide cétonique I, ou l'acide aminé II constitueront également de bons substrats.

Ce mécanisme entraîne une conséquence importante : une transaminase donnée ne présente aucune spécificité pour un couple acide aminé-acide cétonique mais seulement pour des aminoacides ou des acides cétoniques pris individuellement. Par exemple, tous les acides cétoniques susceptibles de réagir avec la forme pyridoxamine de l'enzyme pourront transaminer avec l'acide aminé I ou inversement.

Pour tenter de définir la spécificité de la glutamate-phénylpyruvate transaminase du Chêne, j'ai donc d'une part, identifié les acides aminés intervenant dans la transamination et d'autre part, déterminé l'action de l'enzyme sur quelques acides cétoniques.

1.- Identification des acides aminés intervenant dans la transamination

La détermination de l'efficacité des acides aminés ou amides dans la réaction de transamination de l'acide phénylpyruvique par un extrait de feuilles de Quercus pedunculata a été effectuée à deux stades de purification : après passage sur la colonne de Séphadex G 50 d'une part, et après purification sur Séphadex G 200 et DEAE-cellulose d'autre part. Dans les deux cas (tableau LVII), le donneur préférentiel du groupement aminé est l'acide glutamique. L'acide aspartique constitue également un bon substrat. Ces deux acides dicarboxyliques, ou leurs acides cétoniques, lorsque la transamination est étudiée dans le sens inverse, constituent les substrats

aliphatiques préférentiels des transaminases aromatiques, qu'elles soient bactériennes (SILBERT et al., 1963), animales (CANELLAKIS et COHEN, 1956 ; FONNUM et al., 1964) ou végétales (USPENKAJA et al., 1965).

L'efficacité de quelques autres composés dépend du stade de purification. La glutamine présente une activité assez importante surtout dans l'extrait brut, dans la solution purifiée la transamination est plus faible et devient inférieure à celle de l'asparagine.

TABLEAU LVII

Influence de différents donneurs de $-NH_2$ sur l'intensité de la réaction enzymatique. Enzyme brute, stade de purification : après G 50. Enzyme purifiée, stade de purification : après DEAE-cellulose. Activité spécifique 108. Concentration en substrats 10^{-2} M

Composés aminés	Activités transaminasiques*	
	Enzyme brute	Enzyme purifiée
Ac. glutamique	100,0	100,0
Ac. aspartique	38,7	40,1
Asparagine	12,9	14,2
Glutamine	38,7	12,6
Histidine	17,7	N.D**
Lysine	4,8	0
Arginine	4,8	0
Glycocolle	3,2	0
Cystine	0	N.D
Méthionine	0	N.D
Isoleucine	0	N.D
Leucine	0	N.D
Alanine	N.D**	0
Sérine	N.D	0
Thréonine	N.D	0

* Les valeurs sont comparées à l'activité de l'enzyme en présence d'acide glutamique

** Activité non déterminée.

La lysine, l'arginine et le glycocolle interviennent dans l'extrait brut mais ne conduisent à aucune transamination sous l'influence de l'enzyme purifiée. Cette modification de la spécificité au cours de la purification est peu compatible avec l'intervention d'une seule enzyme dans la transamination de l'acide phénylpyruvique. Elle laisserait plutôt prévoir l'existence d'une transaminase prépondérante ayant pour substrat aminé l'acide glutamique et une seule ou plusieurs autres transaminases agissant sur la glutamine, le glycocolle, l'arginine, la lysine. Ces enzymes, peu actives comparées à la glutamate-phénylpyruvate transaminase, seraient éliminées au cours des

différentes étapes de la purification.

D'autres acides aminés se révèlent totalement inactifs. Parmi ceux-ci on note d'abord la méthionine qui présente pourtant une certaine activité chez E. coli (SILBERT et al., 1963) ainsi que chez le Blé et le Pois (18 % de celle de l'acide glutamique). Mais l'absence de transamination la plus remarquable est celle observée en présence de l'alanine. Chez Phaseolus aureus en effet, l'acide pyruvique constitue un meilleur accepteur du groupement $-NH_2$ de la phénylalanine que l'acide α-cétoglutarique (GAMBORG et WETTER, 1963).

En résumé, les exigences en substrats aminés de la glutamate-phénylpyruvate transaminase du Chêne sont très proches de celles des autres aminotransférases étudiées dans la littérature, exception faite de l'enzyme de Phaseolus aureus.

2.- Action sur quelques acides cétoniques

L'étude de la transamination des acides cétoniques sous l'influence de la préparation enzymatique a été effectuée aux deux stades de purification précédemment définis dans le cas des acides aminés (tableau LVIII).

TABLEAU LVIII

Détermination de quelques activités transaminasiques d'un extrait de feuilles de Quercus pedunculata à deux stades de purification. Donneur du groupement aminé : acide glutamique. Activité spécifique de l'extrait purifié : 80,1

Nature de l'acide cétonique ou aldéhydique	Acides aminés dosés	Quantités formées en µM pour 4 h/ml de solution enzymatique	
		Extrait brut	Extrait purifié
Ac. oxalacétique	Ac. aspartique	13,77	12,15
Ac. pyruvique	Alanine	5,89	0
Ac. glyoxylique	Glycocolle	0,73	0
Ac. mésoxalique	Ac. aminomalonique	0	0
	Glycocolle	0,11	0
Ac. phénylpyruvique	Phénylalanine	0,89	0,39
Ac. p.hydroxyphénylpyruvique	Tyrosine	0,20(1)	0,36(1)
Ac. indolpyruvique	Tryptophane	N.D	+ (2)

(1) Ces valeurs ont été obtenues à partir de solutions enzymatiques différentes entre elles et différentes des solutions utilisées pour la détermination des autres activités enzymatiques

(2) La mise en évidence du tryptophane a été effectuée par chromatographie sur papier

L'extrait brut, uniquement débarrassé des substances de faible poids moléculaire renferme encore la totalité des protéines enzymatiques solubles. Les transaminations observées dans ce cas ne sont donc pas uniquement sous la dépendance

de la glutamique-phénylpyruvique transaminase mais elles sont également dues aux autres enzymes présentes dans le matériel végétal (tableau LVIII). Elles sont indiquées dans ce tableau pour permettre de suivre l'évolution des activités transaminasiques au cours de la purification.

Ainsi que le laissaient prévoir les résultats déjà obtenus (figure 33) la solution enzymatique non purifiée renferme toutes les enzymes recherchées, exception faite de la transaminase de l'acide mésoxalique. De plus, ces dosages confirment la prédominance des glutamique-oxalacétique et glutamique-pyruvique transaminases sur les autres aminotransférases présentes dans les feuilles de Chêne.

L'extrait purifié ne catalyse plus que la synthèse de l'acide aspartique et celle des acides aminés aromatiques : phénylalanine, tyrosine et tryptophane ; parmi les enzymes caractérisées initialement, la purification entraîne donc l'élimination des glutamique-pyruvique et glutamique-glyoxylique transaminases.

Pour la plupart des transaminases végétales, l'acide glutamique constitue sans doute le donneur préférentiel du groupement aminé (SANWAL et al., 1964). Malgré l'activité spécifique élevée de cette solution enzymatique, il est donc difficile de conclure, en se basant sur ces résultats, que les quatre transaminations mises en évidence sont catalysées par une seule et même enzyme. En particulier, il est surprenant de constater que la solution enzymatique, obtenue par un protocole axé sur l'isolement de la glutamique-phénylpyruvique transaminase, assure la transamination de l'acide oxalacétique à une vitesse environ 30 fois plus rapide que celle de l'acide phénylpyruvique. Ce résultat permet d'affirmer que la solution purifiée renferme encore la glutamique-oxalacétique transaminase, enzyme très active chez le Chêne.

Pour expliquer les transaminations mises en évidence dans cet extrait purifié, trois hypothèses sont donc possibles :

- ces transaminations sont catalysées par quatre enzymes distinctes qui n'ont pu être séparées au cours des opérations de purification,
- la solution enzymatique renferme deux enzymes ; l'une responsable de la formation des acides aminés aromatiques, l'autre de celle de l'acide aspartique,
- enfin, ces réactions sont sous la dépendance d'une seule protéine enzymatique.

La distinction entre ces trois hypothèses nécessite donc la détermination du nombre de protéines enzymatiques impliquées dans ces transaminations. Pour dénombrer ces enzymes j'ai utilisé deux techniques différentes. Dans une première série d'expériences j'ai d'abord tenté de séparer, en faisant appel aux méthodes usuelles utilisées dans le fractionnement des protéines, quelques-unes des transaminases figurant dans ce tableau. Puis, j'ai étudié l'action de quelques acides cétoniques sur la transamination de l'acide phénylpyruvique.

V.- ESSAI DE SEPARATION DES TRANSAMINASES DE Q. pedunculata

a.- Sur gels de Séphadex

Sur les colonnes de Séphadex G 50, on constate que les trois transaminases (glutamique-oxalacétique, phénylalanine et tyrosine aminotransférases) sont éluées pour des volumes de tampon identiques (figures 41 et 42).

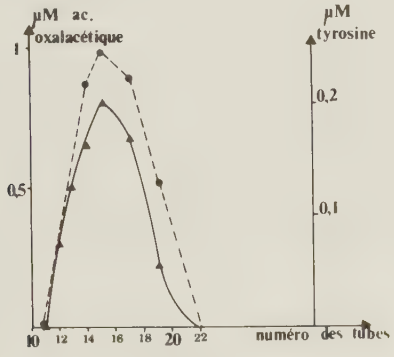


Figure 41

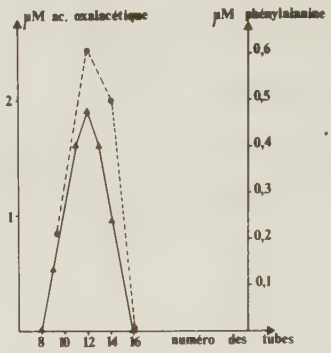


Figure 42

Elution des glutamique-oxalacétique ▲——▲, glutamique-phénylpyruvique ●·····● et glutamique-p.hydroxyphénylpyruvique ●- - - -● transaminases d'une colonne de G 50

Par suite du manque de pouvoir de résolution de cette qualité de gel pour les masses moléculaires supérieures à 10 000, ce résultat indique simplement qu'il n'existe pas de grandes différences entre les poids moléculaires des trois enzymes.

La purification sur Séphadex G 200, gel convenant bien à la séparation des protéines, permet de préciser ce résultat et l'élution des deux enzymes en un seul pic (figure 43) indique qu'elles possèdent des poids moléculaires identiques.

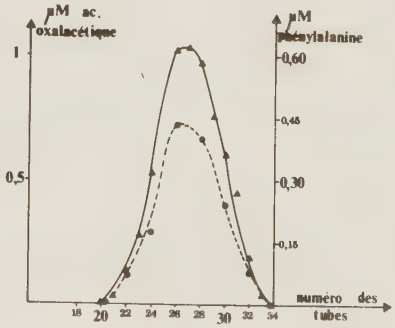


Figure 43

Elution des glutamique-phénylpyruvique ●- - - -● et glutamique-oxalacétique ▲——▲ transaminases d'une colonne de G 200

b.- Sur DEAE-cellulose

Le protocole de purification de la glutamate-phénylpyruvate transaminase sur les colonnes de DEAE-cellulose ne faisait appel qu'à des élutions fractionnées. Ce procédé de développement est moins sélectif qu'un gradient, c'est la raison pour laquelle dans cette étude, l'élution a été réalisée en faisant varier linéairement la force ionique du tampon phosphate entre les concentrations M/200 et M/5. Dans le cas de cette analyse, pour éviter les pertes possibles de certaines activités enzymatiques sur les colonnes de Séphadex G 200, on dépose directement sur la colonne de cellulose un extrait purifié uniquement sur Séphadex G 50.

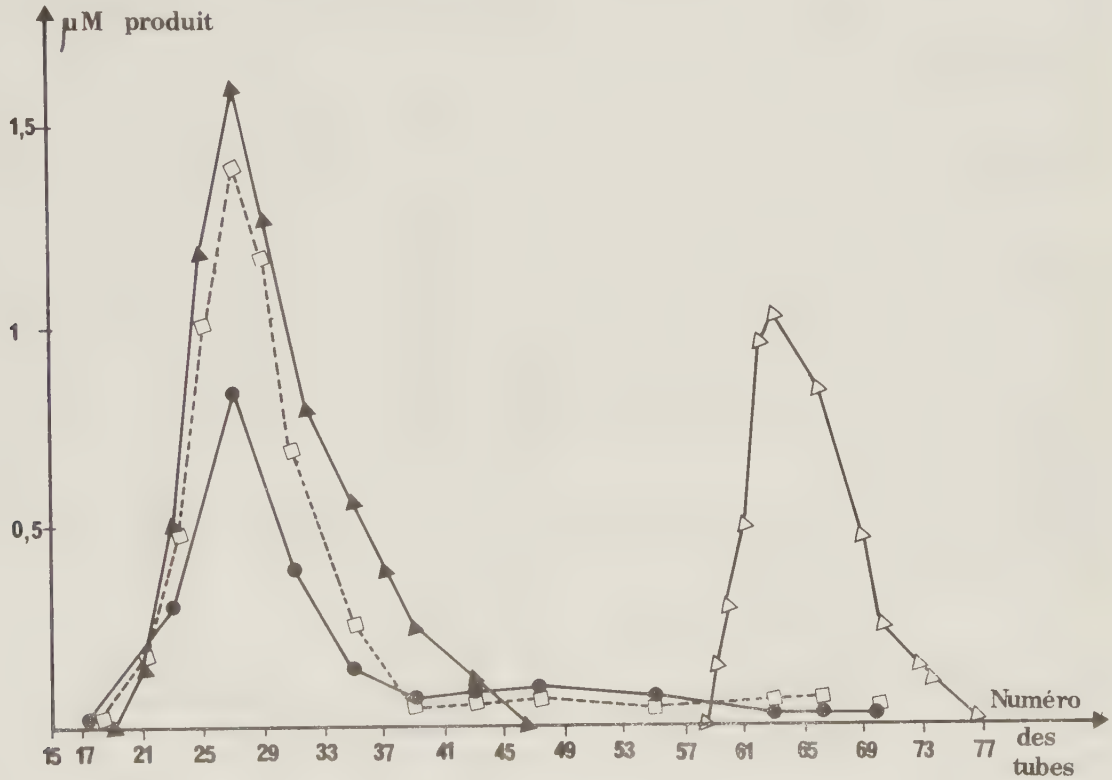


Figure 44

Elution des glutamate-phénylpyruvate, glutamate-p.hydroxyphénylpyruvate, glutamate-oxalacétate et glutamate-pyruvate transaminases d'une colonne de DEAE-cellulose. H = 18 cm, D = 2 cm. Gradient d'élution linéaire.

▲——▲ : glutamate-oxalacétate transaminase. Résultats en µM oxalacétique formé en 15 mn par ml d'enzyme.

□--------□ : glutamate-p.hydroxyphénylpyruvate transaminase. Résultats en µM de tyrosine formée en 4 h par ml d'enzyme.

●——● : glutamate-phénylpyruvate transaminase. Résultats en µM de phénylalanine formée en 4 h par ml d'enzyme.

△——△ : glutamate-pyruvate transaminase. Résultats exprimés en µM d'acide pyruvique formé en 4 h par ml d'enzyme.

Selon ce protocole, la glutamate-oxalacétate ainsi que les phénylalanine et tyrosine transaminases sont éluées de la colonne en un pic aigu et régulier ; dans les trois cas, le contenu du tube 27 présente l'activité maximale (figure 44). Ce résultat contraste avec les données de RED'KINA et al. (1969) qui mentionnent qu'une purification de la glutamique-phénylpyruvique transaminase du Pois par l'utilisation discontinue de tampons de concentrations croissantes conduit à retrouver des activités dans toutes les fractions analysées. Ces auteurs constatent également un comportement très voisin de la glutamate-oxalacétate (GOT) et de la glutamate-phénylpyruvate transaminase (GPPT) sur les colonnes de DEAE-cellulose. Mais dans ce cas, la concordance des activités enzymatiques dans les différentes fractions n'est pas aussi bien respectée que pour le Chêne ; ces auteurs constatent en effet des variations du rapport : $\frac{\text{activité GOT}}{\text{activité GPPT}}$ en fonction de la concentration du tampon d'élution.

Toutefois, dans le cas du Chêne, il faut signaler l'existence d'une très légère activité transaminasique pour les acides cétoniques aromatiques vers le 48e tube alors que la glutamate-oxalacétate transaminase est absente.

Cette figure montre également que la glutamique-pyruvique transaminase constitue une protéine facilement séparable de la glutamique-oxalacétique aminotransférase. Chez le Blé, DAVIES et ELLIS (1961) ont également séparé ces deux protéines enzymatiques. Il est donc probable qu'il existe chez les végétaux au moins deux transaminases distinctes, et par suite que les nombreuses transaminations caractérisées chez les plantes (SANWAL et al., 1964) ne sont pas catalysées par une même protéine ou complexe protéique.

Remarque.- J'ai également vérifié que les glutamique-phénylpyruvique et glutamique-oxalacétique transaminases des galles de Biorhiza étaient éluées en un seul pic d'une colonne de DEAE-cellulose.

c.- Sur hydroxylapatite

Enfin, j'ai tenté de séparer sur gel de phosphate de calcium les enzymes éluées en même temps que la glutamate-oxalacétate transaminase de la colonne de DEAE-cellulose. On constate une nouvelle fois (figure 45) que la majeure partie des deux activités enzymatiques se retrouve dans les fractions obtenues lors de l'élution par les tampons de concentration M/50 et M/25. Pourtant les fractions M/150, M/100, M/10 et M/4 dans lesquelles on n'a pu détecter aucune formation d'acide oxalacétique peuvent néanmoins synthétiser la phénylalanine.

RED'KINA et al. (1969), qui constatent également des variations du rapport $\frac{\text{activité GOT}}{\text{activité GPPT}}$ selon la force ionique des tampons d'élution, sont enclins à penser que ces variations sont imputables à l'existence de deux enzymes distinctes. On peut aussi envisager qu'il n'existe qu'une protéine et que l'absence de formation d'acide oxalacétique par des éluats capables de transaminer l'acide phénylpyruvique n'est que la conséquence des durées très inégales des actions enzymatiques (respectivement 15 mn et 4 heures). Dans ce cas, les enzymes contenues dans ces fractions ne devraient pas avoir des propriétés différentes de celles obtenues pour les concentrations M/50 ou M/25 ; en particulier elles devraient être sensibles à l'inhibition par l'acide oxalacétique (page 164). Effectivement, comme le montrent les résultats ci-

après, cet acide cétonique inhibe totalement la formation de phénylalanine par l'enzyme contenue dans l'éluat "M/10" :

Teneurs en acide oxalacétique	µM phénylalanine formée en 4 heures
0	0,045
50 µM	0

Cette hypothèse est également confirmée par la symétrie de répartition de la glutamique-phénylpyruvique transaminase de part et d'autre des fractions présentant les activités maximales : résultat indiquant que les deux enzymes n'ont aucune tendance à se séparer.

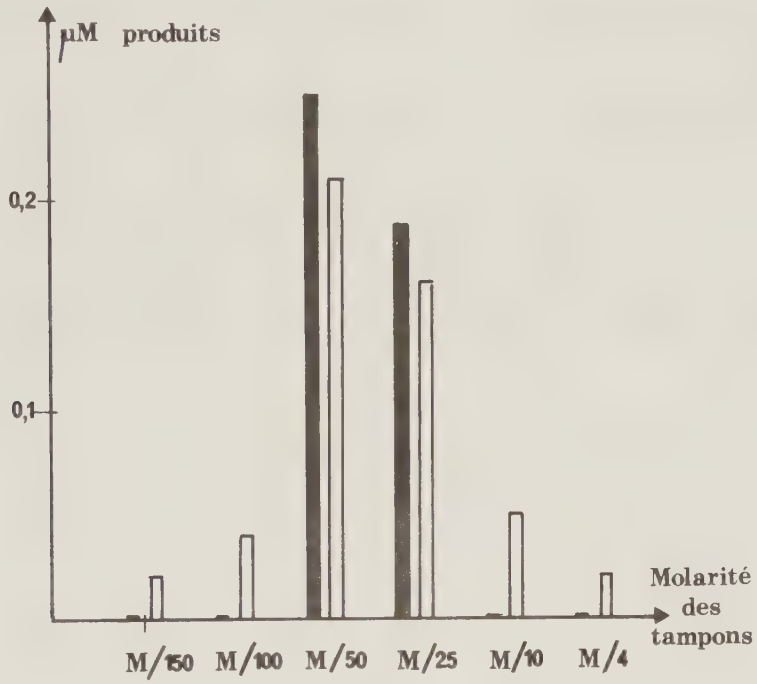


Figure 45

Elution des glutamate-oxalacétate et glutamate-phénylpyruvate transaminases d'une colonne d'hydroxylapatite

Hauteur de la colonne 5 cm, diamètre 1 cm. Elution par du tampon phosphate de molarités croissantes indiquées en ordonnées. Stade de purification de l'enzyme déposée sur la colonne : DEAE-cellulose. Activités exprimées en µM de produits formés en 15 mn pour la glutamique-oxalacétique transaminase, en 4 h pour la glutamique-phénylpyruvique transaminase.

▬ : glutamique-oxalacétique transaminase

▭ : glutamique-phénylpyruvique transaminase.

d.- Discussion des résultats

L'étude du comportement de quelques transaminases du Chêne au cours de leur fractionnement par filtration moléculaire, échange d'ions, adsorption confirme les résultats du tableau LVIII et montre qu'au cours des opérations de purification, on n'observe aucune séparation des enzymes mises en évidence dans l'extrait purifié (glutamique-oxalacétique, glutamique-phénylpyruvique, glutamique-p.hydroxyphénylpyruvique transaminases). Toutefois, le nombre de protéines persistant dans l'extrait purifié est inconnu ; par suite du comportement identique toujours possible de plusieurs enzymes, ou de leurs associations en aggrégats protéiques, l'obtention d'un pic unique ne suffit pas pour démontrer l'intervention d'une seule enzyme dans ces transaminations. Avant de conclure, j'ai donc vérifié ces résultats en étudiant l'action de quelques acides cétoniques sur la transamination de l'acide phénylpyruvique.

VI.- ACTION DE QUELQUES ACIDES CETONIQUES SUR LA GLUTAMIQUE-PHENYLPYRUVIQUE TRANSAMINASE

Afin de clarifier la discussion des résultats, j'envisagerai successivement l'action de l'acide p.hydroxyphénylpyruvique puis celle des acides cétoniques aliphatiques.

a.- Action de l'acide p.hydroxyphénylpyruvique

Pour déterminer l'inhibition de la glutamique-phénylpyruvique transaminase par l'acide p.hydroxyphénylpyruvique, j'ai effectué, à l'aide d'une solution enzymatique purifiée sur DEAE-cellulose, trois essais enzymatiques qui renferment les acides cétoniques suivants :

E_1 : acide phénylpyruvique 50 µM

E_2 : acide p.hydroxyphénylpyruvique 50 µM

E_3 : acide phénylpyruvique 50 µM + acide p.hydroxyphénylpyruvique 50 µM.

Pour ces essais, la teneur en acide glutamique a été élevée à 100 µM, les autres conditions expérimentales demeurant inchangées.

Les quantités d'acides aminés formés dans les trois essais sont indiquées ci-après (résultats exprimés en µM d'acides aminés formés en 4 heures).

	E_1	E_2	E_3
Phénylalanine	0,82	-	0,36
Tyrosine	-	0,76	0,59

On constate que cette préparation enzymatique purifiée peut également transaminer l'acide p.hydroxyphénylpyruvique. Mais de plus, les deux réactions sont catalysées par la même enzyme, les quantités d'acides aminés apparues dans E_3 étant nettement inférieures à leurs valeurs respectives dans E_1 et E_2.

L'essai E_3 montre aussi que pour une même concentration initiale en acides cétoniques, il se forme davantage de tyrosine que de phénylalanine. Ces dosages confirment les résultats obtenus lors de l'étude de la concentration en substrats et mettent en évidence une affinité supérieure de l'enzyme pour le substrat hydroxylé.

Discussion des résultats

En comparant les activités spécifiques, RUDMAN et MEISTER (1953) chez E. coli, GAMBORG et WETTER (1963) chez Phaseolus aureus, ont constaté qu'il n'existe au cours des différentes étapes de la purification aucune séparation des enzymes responsables de la transamination des trois acides aromatiques : phénylalanine, tyrosine et tryptophane. L'étude des transaminases aromatiques du Chêne montre également que ces enzymes ne sont pas séparables par les techniques habituelles de purification enzymatique. De plus, l'acide p.hydroxyphénylpyruvique qui constitue un bon substrat pour l'enzyme purifiée possède une action inhibitrice marquée sur la transamination de l'acide phénylpyruvique. Tous ces résultats permettent de conclure avec GAMBORG et WETTER (1963) que chez les végétaux supérieurs une même enzyme catalyse la transamination des acides cétoniques aromatiques. Cette enzyme, par son manque de spécificité, se rapproche des transaminases bactériennes (RUDMAN et MEISTER, 1953 ; SILBERT et al., 1963 ; O'NEIL et DE MOSS, 1968) mais diffère considérablement des aminotransférases mises en évidence chez les animaux. Chez ces derniers, en effet, il existe au moins deux, sinon trois enzymes distinctes par leur spécificité (KENNEY, 1959) leur stabilité thermique ou leur solubilité (FONNUM et al., 1964).

b.- Action des acides cétoniques aliphatiques

Sur un extrait purifié, et pour des concentrations identiques à celles de l'acide phénylpyruvique, les acides oxalacétique, α-cétoglutarique, mésoxalique et glyoxylique, inhibent totalement la formation de phénylalanine par transamination (tableau LIX). L'acide oxalacétique possède le pouvoir inhibiteur le plus important puisqu'il est le seul à inhiber totalement l'activité enzymatique pour une concentration 10 fois inférieure à celle de l'acide cétonique aromatique. L'acide α-cétoglutarique possède également une action inhibitrice élevée mais toutefois plus réduite que celle de l'acide oxalacétique. Cet effet de l'acide α-cétoglutarique (l'un des produits de la réaction enzymatique) pourrait expliquer l'absence de proportionnalité entre la formation de phénylalanine et la concentration en enzyme pour des teneurs élevées en protéines (figure 37).

L'acide mésoxalique, qui constitue également un inhibiteur puissant de la glutamate-oxalacétate transaminase du Chou-fleur (ELLIS et DAVIES, 1961) possède une action plus marquée que l'acide glyoxylique, son produit de décarboxylation. Enfin, seul parmi les acides cétoniques essayés, l'acide pyruvique ne possède pas d'effet appréciable.

TABLEAU LIX

Inhibition de la glutamique-phénylpyruvique transaminase par les acides cétoniques. Influence de la concentration en acides cétoniques. Stade de purification de l'enzyme : après DEAE-cellulose. Activité spécifique : 108. Teneurs des essais en acide phénylpyruvique : 50 µM

Acides cétoniques	µM présentes dans le milieu	Inhibition en % du témoin
Ac. oxalacétique	50	100
	25	100
	5	100
Ac. α-cétoglutarique	50	100
	25	100
	5	69
Ac. mésoxalique	50	100
	5	84
Ac. glyoxylique	50	100
	25	90
	5	34
Ac. pyruvique	50	7
	25	13
	5	5

J'ai aussi vérifié que l'acide oxalacétique, utilisé à différentes concentrations (5×10^{-3}, 10^{-2} et 2×10^{-2} M) inhibe également la formation de tyrosine. Cet effet de l'acide oxalacétique constitue un argument supplémentaire en faveur de l'existence d'une même enzyme pour transaminer les deux acides cétoniques aromatiques.

Etude du mécanisme d'action des acides cétoniques aliphatiques

Cette inhibition importante, par des acides cétoniques aliphatiques, d'une enzyme ayant pour substrats des composés cyclisés, ne s'accorde pas avec la spécificité que l'on attribue généralement aux enzymes. D'autre part, exception faite de son activité sur les acides indolpyruvique et p.hydroxyphénylpyruvique, le spectre d'action de la glutamate-phénylpyruvate transaminase sur les autres acides cétoniques est inconnu.

Pour tenter d'expliquer le mécanisme de l'inhibition enzymatique par ces acides cétoniques, plusieurs hypothèses sont donc possibles ; on peut en effet concevoir :

- que l'acide cétonique inhibiteur est un meilleur substrat pour l'enzyme que l'acide phénylpyruvique,
- que l'acide cétonique bloque le site actif sans subir de transamination ultérieure.

Pour vérifier ces deux hypothèses, j'ai fait agir l'enzyme purifiée sur l'acide phénylpyruvique en présence de l'un des acides cétoniques du tableau LIX, et après 4 heures d'action j'ai dosé les acides aminés formés (tableau LX).

TABLEAU LX

Transamination, en présence d'acide phénylpyruvique, de quelques acides cétoniques par une solution enzymatique purifiée. Stade de purification : après DEAE-cellulose Activité spécifique : 83. Teneurs des essais en acides cétoniques : 50 µM. Donneur du groupement NH_2 : acide glutamique

Acides cétoniques présents simultanément dans le milieu	Acides aminés dosés	Quantités formées en µM/ 4 heures
Ac. phénylpyruvique	Phénylalanine	0,26
Ac. phénylpyruvique + Ac. pyruvique	Phénylalanine	0,19
	Alanine	0
Ac. phénylpyruvique + Ac. glyoxylique	Phénylalanine	0,03
	Glycocolle	0
Ac. phénylpyruvique + Ac. oxalacétique	Phénylalanine	0
	Ac. aspartique	3,47
Ac. phénylpyruvique + Ac. mésoxalique	Phénylalanine	0
	Ac. aminomalonique	0
	Glycocolle	0

On constate que la solution enzymatique ne peut synthétiser que deux acides aminés : l'acide aspartique et la phénylalanine ; résultat en accord avec les données du tableau LVIII page 156, montrant l'élimination au cours de la purification des glutamique-pyruvique et glutamique-glyoxylique transaminases.

Mais il est surprenant de noter que même en présence de l'acide phénylpyruvique, l'acide oxalacétique subit une transamination beaucoup plus intense que l'acide cétonique aromatique ; la vitesse de formation de l'acide aspartique est en effet 13 fois supérieure à celle de la phénylalanine. L'inhibition de la glutamique-phénylpyruvique transaminase par l'acide oxalacétique, résulte donc de l'aptitude de cette enzyme à aminer beaucoup plus rapidement cet acide cétonique que l'acide phénylpyruvique. Si l'on désigne cette enzyme par ses substrats préférentiels, on doit donc admettre que la transamination de l'acide phénylpyruvique est catalysée par la glutamique-oxalacétique transaminase.

Par contre, l'action des acides glyoxylique et mésoxalique relève d'un mécanisme différent, car on n'observe la formation ni d'acide aminomalonique, ni de

glycocolle. Il faut rapprocher ces résultats de l'inhibition de la glutamique-oxalacétique transaminase du Chou-fleur par l'acide mésoxalique (ELLIS et DAVIES, 1961) qui n'entraîne non plus aucune formation d'acide aminomalonique. Il est donc probable que ces deux inhibiteurs présentent une affinité notable pour le site actif mais que l'enzyme se révèle ensuite incapable d'assurer leur transamination. Enfin, puisque l'acide pyruvique ne possède aucune action, cette inhibition par les acides cétoniques n'est pas générale, mais requiert de la part du composé inhibiteur une structure bien définie. On remarque en effet, que les inhibiteurs les plus efficaces : acides oxalacétique, α-cétoglutarique, glyoxylique, mésoxalique possèdent des groupements carbonyles aux deux extrémités de la molécule, propriété dont est dépourvu l'acide pyruvique.

Action de l'acide oxalacétique sur des préparations enzymatiques non purifiées. Cas des galles et d'autres végétaux

Toutes les expériences réalisées jusqu'à maintenant, ont été effectuées à l'aide d'une enzyme purifiée extraite de feuilles lyophilisées. On peut donc envisager, pour expliquer l'action de cet acide cétonique, soit une altération de la transaminase au cours de la lyophilisation, soit la perte de l'enzyme durant les opérations de purification. D'autre part, l'inhibition de la formation de la phénylalanine par l'acide oxalacétique n'a jamais été signalée dans la littérature, j'ai donc vérifié dans le cas de deux autres végétaux que cette action ne se limite pas à l'enzyme de Q. pedunculata.

Pour ces différentes expériences complémentaires, les déterminations ont été effectuées :

- sur 20 mg de poudre préparée à partir de feuilles de Chêne lyophilisées,
- sur 2 ml d'une suspension enzymatique obtenue à partir de un gramme de feuilles fraîches de Q. pedunculata, Phaseolus vulgaris et Arum italicum selon le protocole décrit pour la caractérisation des transaminases de Q. pedunculata,
- sur 2 ml d'un extrait purifié sur Séphadex G 50 préparé à partir de 2 grammes de galles lyophilisées de Neuroterus quercusbaccarum et de Biorhiza pallida selon les conditions décrites pour l'étude des propriétés de la glutamique-phénylpyruvique transaminase.

On constate pour les trois végétaux et les deux galles étudiées (tableau LXI) une inhibition très élevée de la transamination de l'acide phénylpyruvique en présence d'acide oxalacétique. Cette action de l'acide cétonique aliphatique n'est donc pas spéciale à l'enzyme de Q. pedunculata mais par suite de l'appartenance de ces plantes à des familles systématiquement très éloignées, elle constitue sans doute une propriété générale des transaminases végétales.

Le tableau LXI montre également l'identité de comportement vis-à-vis de l'acide oxalacétique du contenu enzymatique des feuilles fraîches et lyophilisées. L'inhibition par l'acide oxalacétique ne résulte donc pas de la destruction d'une glutamique-phénylpyruvique transaminase spécifique au cours de la lyophilisation mais correspond aux propriétés des transaminases présentes dans le matériel frais.

Enfin, dans tous les cas, exception faite des galles de Neuroterus pour lesquelles les activités étaient très faibles, une concentration en acide oxalacétique (10^{-2} M) suffisante pour inhiber totalement la formation de phénylalanine par

un extrait purifié de feuilles de Chêne laisse persister entre 6 et 34 % de l'activité dans une préparation enzymatique brute. Ce résultat, s'ajoutant aux données obtenues lors de l'étude des substrats aminés confirme l'intervention de plus d'une enzyme dans la transamination de l'acide phénylpyruvique.

TABLEAU LXI

Inhibition par l'acide oxalacétique de la formation de phénylalanine par des préparations enzymatiques non purifiées. Concentration en acide oxalacétique : 10^{-2} M. Résultats exprimés en µM de phénylalanine formée par g de matériel sec pour la poudre et les galles, en g de matériel frais pour les suspensions

Nature du végétal	Phénylalanine formée par g de matériel		% inhibition
	Témoin	Essai inhibé	
Poudre de feuilles de Chênes	36,0	4,50	87
Suspension de feuilles de :			
Quercus pedunculata	10,1	1,50	85
Phaseolus vulgaris	10,1	3,50	66
Arum italicum	45,7	9,80	71
Extrait purifié sur Séphadex G 50 de :			
Galles de Neuroterus	10,5	0	100
Galles de Biorhiza	15,0	0,97	94

Néanmoins, l'activité résiduelle est toujours peu importante, ce qui montre que la majeure partie de la transamination est catalysée par l'enzyme sensible à l'action inhibitrice de l'acide oxalacétique.

c.- Discussion des résultats

L'étude de la spécificité de quelques aminotransférases purifiées montre que chacune de ces enzymes catalyse souvent la transamination de plusieurs acides aminés structuralement proches : c'est le cas de la transaminase des acides aminés ramifiés qui agit sur la leucine, l'isoleucine et la valine (AKI et al., 1968) ou celle des acides aminés aromatiques qui possède comme substrats la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane (RUDMAN et MEISTER, 1953 ; GAMBORG et WETTER, 1963). Les résultats obtenus dans cette étude confirment cette constatation et montrent l'existence d'une seule enzyme pour la transamination des acides cétoniques aromatiques chez les végétaux supérieurs.

S'il est aisé de concevoir l'existence d'une même enzyme pour des composés présentant des analogies de structure, il est plus difficile d'admettre l'intervention d'un même catalyseur pour des acides cétoniques très différents entre eux, tels les acides oxalacétique et phénylpyruvique.

RUDMAN et MEISTER, en 1953, par les méthodes usuelles de purification enzymatique, isolèrent à partir de E. coli trois aminotransférases dont l'une : la transaminase A, agit essentiellement sur les acides aminés (ou leurs acides cétoniques)

suivants : acides glutamique et aspartique, phénylalanine, tyrosine et tryptophane. Les vitesses des transaminations entre l'acide α-cétoglutarique et les différents acides aminés dépendent cependant du produit considéré, l'acide aspartique étant le substrat préférentiel. Par des techniques différentes (répression, étude de la stabilité thermique,...) SILBERT et al. (1963) mirent en évidence chez cette même bactérie une aminotransférase plus spécifique de la phénylalanine, mais confirmèrent également l'existence et la spécificité de la transaminase A.

Chez les végétaux supérieurs, certains résultats obtenus à l'heure actuelle semblent contredire cette conclusion. ELLIS et DAVIES, en 1961, ne constatèrent aucune transamination entre l'acide α-cétoglutarique et la tyrosine sous l'influence de la glutamate-oxalacétate aminotransférase purifiée du Chou-fleur. Toutefois, il faut souligner que les conditions expérimentales retenues par ELLIS et DAVIES : mise en évidence de l'acide glutamique, valeur du pH d'action (7 au lieu de 8,5), se révèlent défavorables à la détection de cette activité enzymatique.

Dans un travail récent, RED'KINA et al. (1969) ont également mis en évidence dans un extrait purifié de Pois l'existence d'une glutamique-oxalacétique aminotransférase 15 à 30 fois plus active que la glutamate-phénylpyruvate transaminase du même extrait. L'utilisation de différentes techniques (gel d'alumine, hydroxylapatite, DEAE-cellulose) ne leur permit pas d'obtenir une séparation appréciable des deux enzymes. Pourtant, en se basant sur l'influence de la température, des inhibiteurs et du pyridoxal-phosphate, ces auteurs pensent que la préparation enzymatique renferme deux enzymes distinctes : l'une responsable de la transamination de l'acide phénylpyruvique, l'autre de celle de l'acide oxalacétique.

Par leur identité de comportement sur gels de Séphadex, sur DEAE-cellulose, ou sur hydroxylapatite, les enzymes extraites du Chêne se rapprochent de celles étudiées chez le Pois. Cependant, la mise en évidence de certaines propriétés de la glutamique-phénylpyruvique transaminase non envisagées par RED'KINA et al. (1969) ne permet pas de souscrire aux conclusions de ces auteurs.

En premier lieu, il faut retenir le rôle inhibiteur de l'acide oxalacétique. En présence de l'enzyme purifiée, cet acide cétonique inhibe totalement la formation de phénylalanine et subit une transamination très intense pour former l'acide aspartique. Ces deux résultats révèlent la présence de la glutamique-oxalacétique transaminase dans la solution, et montre que l'acide phénylpyruvique se fixe sur l'enzyme en un même site actif que l'acide cétonique aliphatique. La vitesse de formation de l'acide aspartique, environ 30 fois plus rapide que celle de la phénylalanine indique que l'acide oxalacétique constitue le substrat préférentiel : l'enzyme incriminée dans la transamination de l'acide phénylpyruvique est donc très probablement la glutamique-oxalacétique transaminase.

L'intervention de cette enzyme est confirmée :

- d'abord par l'action inhibitrice des acides α-cétoglutarique et mésoxalique qui constituent des substrats ou des inhibiteurs de cette transaminase,
- ensuite par la nature des donneurs les plus efficaces du groupement aminé : les acides aspartique et glutamique qui sont les substrats de la glutamique-oxalacétique aminotransférase.

Enfin, il faut souligner que l'acide pyruvique dont la transamination est catalysée par une enzyme totalement différente ne présente aucun pouvoir inhibiteur

et que l'alanine est inefficace comme donneur du groupement $-NH_2$.

Les vitesses de formation de la phénylalanine ou de la tyrosine, considérablement plus faibles que celles de l'acide aspartique indiquent que la substitution du carboxyle de l'acide oxalacétique par un noyau benzénique (acide phénylpyruvique) ou phénolique (acide p.hydroxyphénylpyruvique) réduit considérablement l'affinité de ces acides cétoniques pour l'enzyme, sans doute par suite de l'encombrement stérique dû au noyau benzénique. On peut également penser, dans le cas de l'acide p.hydroxyphénylpyruvique que la présence d'un OH phénolique, en augmentant le caractère acide du noyau aromatique accroît l'affinité de la molécule pour le site catalytique et explique ainsi la vitesse plus rapide de transamination de l'acide cétonique hydroxylé.

VII.- RESUME ET CONCLUSIONS

Les feuilles de Chêne et les galles possèdent des activités transaminasiques multiples intéressant la plupart des acides aminés et les acides α-cétoglutarique et pyruvique. Ces différentes enzymes présentent pourtant des importances très inégales ; les transaminases les plus actives étant les glutamique-oxalacétique et glutamique-pyruvique transaminases.

La mise au point d'une méthode originale de détermination de l'activité enzymatique et l'élaboration d'un protocole de purification m'a permis de constater que la glutamique-phénylpyruvique transaminase, présente dans les différents organes des jeunes plantes de Chêne et dans les galles induites sur ce végétal par les Cynipides, manifeste dans tous les cas une activité peu élevée. Ces résultats confirment les données obtenues sur d'autres végétaux (WILSON et al., 1954 ; USPENKAJA et al., 1965) et montrent que les transaminases des acides aminés aromatiques constituent des enzymes peu actives dans le règne végétal. Ces activités transaminasiques réduites pourraient être une des causes des faibles quantités d'acides aminés aromatiques rencontrés à l'état libre chez le Chêne.

Parmi les transaminases végétales purifiées, l'enzyme du Chêne se rapproche de celle présente dans le Pois, mais diffère en de nombreux points (ordre d'efficacité des substrats, exigence en cofacteur,...) de la transaminase aromatique purifiée, par GAMBORG et WETTER (1963), à partir de Phaseolus aureus. La comparaison des enzymes végétales aux transaminases animales accentue encore cette dissemblance. Chez les animaux en effet, il existe plusieurs transaminases et ces enzymes favorisent la formation des acides cétoniques aromatiques, alors que la seule protéine enzymatique des végétaux catalyse préférentiellement la synthèse des acides aminés.

L'étude de la spécificité de la transaminase et la détermination des activités enzymatiques, au cours des différentes étapes de la purification, permet de confirmer l'hypothèse de GAMBORG et WETTER (1963), et montre que chez les végétaux une seule enzyme intervient dans la transamination des acides cétoniques aromatiques. La comparaison de cette enzyme aux autres transaminases permet de la différencier nettement de la glutamique-pyruvique aminotransférase. Par contre, son activité très élevée sur l'acide oxalacétique, le rôle inhibiteur de cet acide cétonique dans la transamination de l'acide phénylpyruvique et l'absence de séparation des deux enzymes, au cours des purifications successives, conduisent à penser que la transamination des acides cétoniques aromatiques est catalysée par la glutamique-oxalacétique transaminase.

Cette constatation présente comme conséquence logique qu'il n'existe chez les plantes qu'un nombre restreint de transaminases distinctes, ces quelques enzymes pouvant, par suite de leur manque de spécificité, catalyser les nombreuses réactions de transamination mises en évidence chez les végétaux. Pourtant, à la suite des conclusions de RED'KINA et al. (1969) qui pensent que chez le Pois les formations d'acide aspartique et de phénylalanine sont catalysées par deux enzymes distinctes, il sera nécessaire, avant de généraliser ces résultats avec certitude, d'étudier la spécificité de la glutamique-oxalacétique aminotransférase isolée d'autres végétaux.

CONCLUSIONS GENERALES

Dans le domaine de la pathologie végétale, l'action des agents cécidogènes sur leur plante-hôte constitue un cas unique de parasitisme, au cours duquel l'organisme pathogène induit la différenciation d'une structure nouvelle, spécifique et souvent distincte morphologiquement de l'organe attaqué. Un des objectifs de ce travail a été d'apporter des indications nouvelles sur la constitution et le métabolisme de ces productions pathologiques. J'ai retenu comme plante-hôte, le Chêne, et comme formations parasitaires les cécidies engendrées par ce végétal sous l'action des Cynipides gallicoles.

Dans la première partie, surtout analytique, j'ai tenté de dégager les caractéristiques biochimiques essentielles des tissus cécidiens, après avoir approfondi certains aspects du métabolisme azoté du Chêne.

Dans les graines de Quercus pedunculata, les protéines constituent la majeure partie des substances azotées de réserve. Au cours du développement de la plante, leur utilisation fait appel à une protéolyse intense et les acides aminés apparus migrent, dès leur libération, vers les tiges et surtout vers les racines.

Dans la jeune plante, les amides, la sérine, les acides glutamique et aspartique, l'alanine et l'arginine représentent les composés aminés les plus abondants à l'état libre. L'afflux massif de substances azotées, dans les tiges et les racines, s'accompagne de la mise en jeu de processus de stockage de l'excédent d'azote qui entraîne, en particulier, une accumulation d'asparagine et d'arginine.

Indépendamment de leur origine (jeune Chêne ou arbre situé en plein champ), les feuilles se signalent toujours par une protéogénèse active et un taux très bas de composés azotés solubles. Au cours d'une année végétative, les teneurs les plus élevées en azote total se rencontrent dans les feuilles jeunes ; elles s'abaissent au cours de la croissance foliaire, puis se stabilisent dans les feuilles bien développées et enfin subissent une nouvelle diminution en automne.

Dans la fraction azotée soluble, les fluctuations des teneurs globales en acides aminés et peptides sont comparables à celles de l'azote total : les taux les plus élevés s'observent soit immédiatement, soit dans un délai de quelques jours après le débourrement. Au cours du développement des feuilles, la diminution des concentrations totales s'accompagne d'une évolution des proportions relatives ; la richesse en alanine, tyrosine et proline est un critère de jeunesse tandis que la dominance des acides glutamique et aspartique caractérise la sénescence.

Enfin, malgré l'orientation du métabolisme du Chêne vers les composés phénoliques, la tyrosine et la phénylalanine n'occupent qu'une place restreinte dans le pool azoté total. Néanmoins, dans les conditions artificielles de culture, leur métabolisme est affecté : les feuilles obtenues en salle conditionnée se distinguent de celles récoltées en plein champ par une proportion relative plus élevée de phénylalanine que de tyrosine.

Les recherches d'ordre cécidologique ont porté sur les galles induites par Neuroterus quercusbaccarum, Biorhiza pallida, Cynips quercustozae et Dryophanta folii sur les feuilles et dans les bourgeons de Chêne.

L'identification des glucides solubles, des acides organiques, des acides aminés et des acides phénoliques n'ont permis, au plus, de mettre en évidence dans les tissus parasitaires que les constituants détectés dans les feuilles. Les galles de ces Cynipides n'élaborent donc pas de substances azotées typiquement cécidiennes, telles les guanidines monosubstituées caractérisées dans les tumeurs d'Agrobacterium tumefaciens (MOREL et DURANTON, 1959).

Elles possèdent néanmoins en commun des particularités biochimiques qui les différencient des feuilles :

- teneurs en eau très importantes (jusqu'à 93 % de la matière fraîche),
- présence de grandes quantités de substances faiblement polymérisées : environ 80 % des constituants de la galle de Dryophanta sont solubles dans un mélange hydroalcoolique,
- contingent élevé d'oses réducteurs (glucose et fructose essentiellement),
- abondance, enfin, des composés azotés solubles dans le pool total. Dans les galles de Neuroterus, les protéines ne représentent que 40 % environ des composés azotés totaux alors que, dans les feuilles, elles en constituent toujours plus de 94 %.

Malgré ces similitudes, les tissus cécidiens demeurent fort dissemblables entre eux et il apparaît que les différences quantitatives dans leurs compositions sont d'abord fonction de l'époque de l'année à laquelle s'est développée la galle. Les cécidies printanières de Biorhiza et de Neuroterus possèdent des teneurs en eau très élevées (supérieures à 80 %), présentent des acidités organiques supérieures à celles des feuilles prises pour référence, se caractérisent par la prépondérance des intermédiaires du cycle de KREBS sur les acides alicycliques, et renferment des taux élevés de composés azotés. Au contraire, les galles de Cynips et de Dryophanta formées à une époque avancée de la période végétative sont plus pauvres en eau, en composés azotés solubles et insolubles et contiennent davantage d'acides alicycliques que d'acides di- ou tricarboxyliques.

L'étude détaillée des constituants azotés confirme cette relation et permet d'avancer une explication au synchronisme : contenu/époque de formation. Dans toutes les galles, les valeurs élevées du rapport $\frac{\text{N soluble}}{\text{N total}}$ sont dues aux fortes teneurs en acides aminés et amides libres parmi lesquels l'asparagine, la sérine, les acides glutamique et aspartique, l'alanine et l'arginine occupent toujours une place prépondérante. La présence de grandes quantités d'asparagine et à un degré moindre d'arginine est typique des galles printanières aux taux élevés en composés azotés solubles. Alors que d'autres processus de mises en réserve de l'azote fonctionnent dans le règne végétal : accumulation d'arginine chez le Topinambour (DURANTON, 1959) et chez le Pin (GUITTON, 1964), de citrulline chez les Cucurbitacées (TOUZÉ, 1964), d'homosérine chez le Pois (GOAS, 1965), il faut souligner que les cécidies utilisent les mécanismes de stockage des organes normaux (tiges et racines). Les gènes commandant cette partie du métabolisme n'ont donc subi ni altération ni mutation sous l'action des substances sécrétées par les insectes gallicoles.

Pour leur majeure partie, ces acides aminés et amides ne semblent pas provenir d'une hydrolyse des protéines de la cécidie mais d'une migration de la plante-

hôte. L'influence minime des galles foliaires sur leur support permet de penser que l'ensemble du végétal et non seulement l'organe attaqué participe à la nutrition de la cécidie. A la reprise de la végétation, les galles bénéficient, au même titre que les bourgeons, de la mobilisation des réserves azotées contenues dans les organes vivaces. Au cours de l'été par contre, les organes sains, plus pauvres en substances facilement utilisables, ne peuvent fournir aux galles que des quantités limitées de certains métabolites.

Sans nier l'importance capitale de l'action de chaque agent cécidogène, il semble donc qu'elle ne détermine pas à elle seule la composition de la cécidie. La plante-hôte joue également un rôle essentiel en mettant à la disposition de la formation parasitaire des quantités plus ou moins élevées d'eau, de sels minéraux ou de substances déjà élaborées (glucides, acides organiques, acides aminés,...).

Au niveau du métabolisme intermédiaire, très assujetti à celui de l'hôte, il est donc difficile de déceler les originalités biochimiques de chaque cécidie. En revanche, l'étude des produits secondaires du métabolisme fournit un moyen plus aisé de les mettre en évidence. Ainsi, les galles estivales de Cynips et de Dryophanta pourtant très proches par leurs teneurs en acides organiques et en acides aminés contiennent des taux dissemblables d'acides phénoliques ; la première possède un contenu riche et varié alors que la seconde ne renferme que certains termes de la série benzoïque.

X

X X

La seconde partie de ce travail s'insère dans la cadre général d'une étude sur le métabolisme des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Elle traite plus spécialement de la biosynthèse de la tyrosine et de la phénylalanine, précurseurs directs des acides phénoliques chez le Chêne, et acides aminés essentiels à la vie des larves qui se nourrissent aux dépens des galles.

Dans les cécidies, comme dans le végétal sain, l'élaboration du squelette carboné de ces acides aminés s'effectue par la voie de l'acide shikimique ; la phénylalanine constitue, dans tous les cas, le composé le plus rapidement synthétisé à partir du glucose ou du précurseur alicyclique.

Les incorporations d'acides chorismique, préphénique, phénylpyruvique, et p.hydroxyphénylpyruvique à des tiges feuillées démontrent leur rôle d'intermédiaires dans cette voie biosynthétique. Leurs transformations, in vivo, sont catalysées par des

enzymes mal connues dont l'étude, in vitro, a nécessité la mise au point d'une méthodologie spéciale permettant leur extraction quantitative à partir d'un matériel végétal particulièrement riche en substances phénoliques inhibitrices.

Sous l'influence de la chorismate-mutase, l'acide chorismique produit l'acide préphénique point de divergence des voies menant aux deux acides aminés aromatiques. L'enzyme peu active dans les cotylédons est bien représentée dans tous les autres organes des Chênes ; sa concentration maximale se rencontre dans les jeunes tiges. Elle est également présente dans les cécidies de Biorhiza et de Neuroterus confirmant ainsi l'existence de la voie de l'acide shikimique dans ces formations pathologiques.

Dans le tampon phosphate, elle manifeste son activité optimale à pH 7,5 et sa vitesse d'action varie en fonction de la concentration en substrat selon la loi de MICHAELIS. Stable dans le matériel lyophilisé et en solutions faiblement alcalines, elle est rapidement dégradée en milieu légèrement acide et au cours des tentatives de purification.

Par ses propriétés allostériques, la chorismate-mutase joue un rôle important dans la régulation de la biosynthèse des acides aminés aromatiques. Elle est rétroinhibée par les deux aminoacides dont elle commande l'élaboration : tyrosine et phénylalanine. Le composé hydroxylé possède une affinité supérieure à celle de la phénylalanine pour le site allostérique unique de la mutase. Le tryptophane, activateur de la catalyse enzymatique possède, de plus, le pouvoir de lever l'inhibition causée par les effecteurs négatifs. Tous ces ligands n'influencent que la vitesse maximale de la réaction et non l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Contrairement aux autres chorismate-mutases bactériennes ou fongiques, l'enzyme non purifiée de Q. pedunculata présente donc les caractéristiques des enzymes allostériques du type V.

L'amination des acides phénylpyruvique et p.hydroxyphénylpyruvique constitue la dernière étape de la biosynthèse de la phénylalanine et de la tyrosine. Elle est catalysée par une seule transaminase pour laquelle l'acide cétonique hydroxylé constitue le substrat aromatique préférentiel. Cette enzyme existe dans les galles et dans tous les organes des plantes mais à des taux considérablement plus réduits que ceux des deux aminotransférases les plus abondantes dans le Chêne : les glutamique-oxalacétique et glutamique-pyruvique transaminases. Cette faible intensité de la transamination et le contrôle de l'activité de la chorismate-mutase par les trois acides aminés aromatiques expliquent sans doute, pour une grande part, la présence de ces composés en très faibles quantités à l'état libre dans les différents organes du Chêne et dans les cécidies.

Facilement soluble, la transaminase est stable en milieu faiblement alcalin. Cette propriété a permis la mise au point d'un protocole conduisant à la purifier environ 180 fois. L'enzyme est aisément séparable de la glutamique-pyruvique aminotransférase mais présente, en revanche, un comportement chromatographique identique à la glutamique-oxalacétique transaminase. Par ailleurs, l'acide oxalacétique constitue à la fois un excellent substrat pour l'enzyme purifiée et un inhibiteur puissant de la transamination de l'acide phénylpyruvique. Le transfert du groupement $-NH_2$ sur les acides oxalacétique et phénylpyruvique semble donc catalysé par une même protéine enzymatique. Cette enzyme présente son affinité maximale pour les substrats aliphatiques ;

on doit donc admettre que la transamination des acides cétoniques aromatiques est sous la dépendance de la glutamique-oxalacétique transaminase.

Dans le tampon pyrophosphate, son action sur l'acide phénylpyruvique est optimale à pH 8,5. L'acide glutamique constitue le donneur préférentiel du groupement $-NH_2$; il ne peut être suppléé, avec une efficacité moindre toutefois, que par l'acide aspartique, l'asparagine et la glutamine. Au cours des opérations de purification, l'enzyme subit une perte partielle de son cofacteur ; l'addition de pyridoxalphosphate permet de rétablir l'activité initiale. Sa propriété de catalyser préférentiellement la synthèse des aminoacides aromatiques à partir de leurs précurseurs est également marquante ; elle la distingue des transaminases animales qui jouent surtout un rôle catabolique en favorisant la formation des acides cétoniques aromatiques. Enfin, l'action de l'enzyme purifiée est ralentie ou supprimée sous l'influence de composés très divers : réducteurs, composés phénoliques, acides organiques ; les mécanismes mis en cause semblent spécifiques de la nature de l'inhibiteur incriminé.

En conclusion , ce travail a permis de préciser quelques aspects de la physiologie et de la biochimie du Chêne, et de mettre en évidence certaines particularités du métabolisme des zoocécidies engendrées par ce végétal sous l'action des Cynipides gallicoles. Il ouvre aussi la voie à de nouvelles recherches parmi lesquelles la définition rigoureuse de la spécificité des transaminases, l'étude des phénomènes de régulation au niveau des autres enzymes de la voie de l'acide shikimique, la caractérisation d'aggrégats ou de complexes multi-enzymatiques, leur localisation cellulaire, l'approfondissement de la biochimie des tissus cécidiens, me semblent les plus dignes d'intérêt. Je me propose donc, dans un proche avenir d'aborder l'étude de ces domaines encore peu explorés de la physiologie végétale.

BIBLIOGRAPHIE

ADLER H., 1877 - Beitrag zur Naturgeschichte der Cynipiden. Dtsche entomol. Z., 21, 209-248.

ADLER H., 1881 - Uber den Generationswechsel der Eichen-Gallwespen. Z. wissensch. Zool., 35, 151-246.

AKI K., OGAWA K. et ICHIHARA A., 1968 - Transaminases of branched chain amino acids. IV. Purification and properties of two enzymes from rat liver. Biochim. Biophys. Acta, 159, 276-284.

ALIBERT G., 1968 - Les acides phénoliques chez Quercus pedunculata. Thèse Doct. Spécialité (Physiologie Végétale) Toulouse.

ALIBERT G., MARIGO G. et BOUDET A., 1969 - Recherches sur la biosynthèse des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Identification des acides phénoliques de Quercus pedunculata Ehrh. Physiol. vég., 7, 57-68.

ANDERS F., 1958 - Aminosaüren als gallenerregende Stoffe der Reblaus. Viteus (Phylloxera) vitifolii Shimer. Experientia, 14, N° 2, 62-63.

ANDERSON J.W. et ROWAN K.S., 1967 - Extraction of soluble leaf enzymes with thiols and other reducing agents. Phytochemistry, 6, 1047-56.

ARYA H.C., HILDEBRANDT A.C. et RIKER A.J., 1962 - Nucleic acids in callus tissues from grape stem and Phylloxera gall. Phyton. Argent., 19, N° 1, 27-29.

BAKER C.J.L., 1952 - The determination of oxalate in fresh plant material. Analyst, 77, 340-344.

BAKER T.I., 1966 - Tryptophan : a feedback activator for chorismate-mutase from Neurospora. Biochemistry, 5, 2654-2657.

BALINSKY D. et DAVIES D.D., 1961 a - Aromatic biosynthesis in higher plants. I. Preparation and properties of dehydroshikimic reductase. Biochem. J., 80, 292-296.

BALINSKY D. et DAVIES D.D., 1961 b - Aromatic biosynthesis in higher plants. III. Preparation and properties of dehydroquinase. Biochem. J., 80, 300-304.

BECK E.G., 1946 - A study of Solidago gall caused by Eurosta solidaginis. (Résumé). Amer. J. Bot., 33, p. 228.

BELEY J., 1948 - Dosage des éléments minéraux chez les végétaux. in Traité pratique de Chimie végétale. Vol. II. A. BRUNEL, éd., Georges Frères Tourcoing Nord. 441-447.

BEYERINCK M.W., 1883 - Beobachtungen über die ersten Entwicklungsphasen einiger Cynipidengallen. Verh. kkl. vlaamse Acad. Wetensch. 22, 1-198.

BLUNDEN G. et CHALLEN S.B., 1965 - Red pigment in leaf galls of Salix fragilis L. Nature, 208, N° 5008, 388-389.

BOHM B.A. et TOWERS G.H.N., 1962 - A study of phenolic compounds in Impatiens. Canad. J. Bot., 40, 677-683.

BOLLARD E.G. et MATTHEWS R.E.F., 1966 - The physiology of parasitic disease. in Plant physiology. Vol. IV b. F.C. STEWARD éd., Academic press New York, London, p. 448.

BOUDET A., 1965 - Sur l'inhibition des enzymes par les tannins des feuilles de Quercus sessilis Ehrh. La levée d'inhibition. C. R. Acad. Sci., 261, 214-217.

BOUDET A., 1968 - Communication personnelle.

BOUDET A., 1969 - Recherches sur la biosynthèse des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Intervention de l'acide quinique dans la biosynthèse de la phénylalanine chez Quercus pedunculata Ehrh. C. R. Acad. Sci., 269, 1966-1968.

BOUDET A. et GADAL P., 1965 - Sur l'inhibition des enzymes par les tannins des feuilles de Quercus sessilis Ehrh. Isolement des tannins. C. R. Acad. Sci., 260, 4057-4060.

BOUDET A., GADAL P., ALIBERT G. et MARIGO G., 1967 - Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Mise en évidence des précurseurs alicycliques chez Quercus pedunculata. Acides quinique, 5-déshydroquinique, 5-déshydroshikimique et shikimique. C. R. Acad. Sci., 265, 119-122.

BOUYSSOU H., GADAL P. et BOUDET A., 1967 - Variations annuelles de quelques formes azotées et des acides aminés dans les feuilles de Quercus pedunculata Ehrh. C. R. Acad. Sci., 265, 1702-1705.

BOVE J. et RAVEUX R., 1957 - La séparation et la détermination des acides carboxyliques de C_1 à C_6 par chromatographie de partage sur silice. II. Nouvelle technique proposée. Bull. Soc. Chim. Fr., 376-381.

BRAUNSTEIN A.E., 1947 - Transamination and the integrative functions of the dicarboxylic acids in nitrogen metabolism. Adv. Protein Chem., 3, 1-52.

BRAUNSTEIN A.E. et KRITZMAN M.G., 1937 - Formation and breakdown of aminoacids by intermolecular transfer of the amino group. Nature, 140, 503-504.

BRAY G.A., 1960 - A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillator counter. Anal. Biochem., 1, 279-285.

BRIENS M., 1967 - Contributions à l'étude du métabolisme des halophytes : les acides α-cétoniques de Sueda macrocarpa et de Aster tripolium . C. R. Acad. Sci., 264, 2296-2299.

BRONNER R., 1969 - Localisation histochimique des produits aminés solubles et des aminopeptidases dans les tissus nourriciers des galles de Cécidomyides. C. R. Acad. Sci., 268, 810-812.

BRONNER R. et MEYER J., 1968 - Mise en évidence histochimique de l'abondance des produits aminés solubles dans les tissus nourriciers des galles. Marcellia, 34, 99-104.

BRUNET P.C.J., 1963 - Tyrosine metabolism in insects. Ann. New York Acad. Sci., 100, 1020-1034.

BUHR H., 1964 - Bestimmungstabellen der Gallen (Zoo-und Phytoceciden) an Pflanzen Mittel-und Nordeuropas. G. Fischer Verlag éd., Paris.

CAMUS A., 1938 - Les Chênes. Tome I. Genre Quercus. Paul Le Chevallier éd., Paris.

CANELLAKIS Z.N. et COHEN P.P., 1956 - Purification studies of tyrosine α-cetoglutaric acid transaminase. J. Biol. Chem., 222, 53-62.

CARLES J., SCHNEIDER A. et LACOSTE A.M., 1958 - Contribution à l'étude chromatographique des principaux acides organiques. Bull. Soc. Chim. biol., 40, 221-231.

CAVALIÉ G., 1969 - L'anthracnose du Haricot ; son incidence sur le métabolisme de l'acide malonique. Thèse Doct. Sci. nat., Toulouse.

CHANGEUX J.P., ULLMAN A. et MONOD J., 1965 - Un modèle plausible de la transition allostérique. in Mécanismes de régulations des activités cellulaires chez les microorganismes. C.N.R.S. éd., 285-295.

CHOUARD P., 1952 - Cultures sans sol. Maison rustique éd., Paris.

COHEN G.N., 1965 - Regulation of enzyme activity in microorganisms. Annu. Rev. Microbiol., 19, 105-126.

COMBES R., 1926 - Etude de la migration automnale des substances azotées chez le Chêne par l'analyse des plantes entières. C. R. Acad. Sci., 182, 984-987.

COSENS A., 1912 - A contribution to the morphology and biology of insect galls. Trans. canad. Inst., 9, 297-387.

COTTON R.G.H. et GIBSON F., 1965 - The biosynthesis of phenylalanine and tyrosine enzymes converting chorismic acid into prephenic acid and their relationship to prephenate dehydratase and prephenate dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta, 100, 76-88.

COTTON R.G.H. et GIBSON F., 1968 - The biosynthesis of phenylalanine and tyrosine in the pea (Pisum sativum). Chorismate-mutase. Biochim. Biophys. Acta, 156, 187-189.

CROMBIE W.M., 1960 - Metabolism of extracyclic organic acids. Encycl. plant Physiol., 12, N° 2, 890-933.

CRUICKSHANK D.H. et ISHERWOOD F.A., 1958 - Glutamic-alanine and glutamic-aspartic transaminases of wheat germ. Biochem. J., 69, 189-195.

DALY J.W., 1967 - Phenolic mediators of animal metabolism. in Phenolic compounds and metabolic regulation, FINKLE B.J. and RUNECKLES V.C. éd., Appleton century Crofts New York, 27-67.

DAVIES D.D. et ELLIS R.J., 1961 - Glutamic-oxalacetic transaminase of Cauliflower. II. Kinetics and mechanism of action. Biochem. J., 78, 623-630.

DAVIS B.D., 1955 - Intermediates in aminoacid biosynthesis. Adv. in Enzymol., 16, 247-312.

DAYAN J. et SPRINSON D.B., 1968 - Chorismate-mutase in complementing tyrosine auxotrophs of Salmonella typhimurium. Feder. Proc., 27, p. 290.

DURANTON H., 1959 - Etude du métabolisme de l'arginine libre dans les tissus de Topinambour cultivés in vitro. Thèse Doct. Sci. nat., Paris.

EDWARDS J.M. et JACKMAN L.M., 1965 - Chorismic acid. A branch point intermediate in aromatic biosynthesis. Austral. J. Chem., 18, 1227-1239.

ELLIS R.J. et DAVIES D.D., 1961 - Glutamic-oxalacetic transaminase of Cauliflower. Purification and specificity. Biochem. J., 78, 615-623.

FEENY P.P. et BOSTOCK H., 1968 - Seasonal changes in tannin content of oak leaves. Phytochemistry, 7, 871-880.

FOLLIOT R., 1964 - Contribution à l'étude de la biologie des Cynipides gallicoles (Hyménoptères cynipoïdea). Thèse Doct. Sci. nat., Rennes.

FONNUM F., HAAVALDSEN R. et TANGEN O., 1964 - Transamination of aromatic aminoacids in rat brain. J. Neurochem., 11, N° 2, 109-118.

FOURCROY M. et BRAUN C., 1967 - Observations sur la galle d'Aulax glechomae L. II. Histologie et rôle physiologique de la coque sclérifiée. Marcellia, 34, 3-30.

FOWDEN L., 1965 - Origins of the aminoacids. in Plant Biochemistry. J. BONNER et J.E. VARNER éd., Academic press New York, London, 361-390.

FREUDENBERG K., 1920 - Die Chemie der natürlichen Gerbstoffe. Springer Verlag Berlin.

GADAL P., ALIBERT G. et MARIGO G., 1968 a - Les Zoocécidies du genre Quercus. Etude des acides phénoliques des galles de Cynips quercustozae et Cynips quercusfolii. Marcellia, 35, 241-246.

GADAL P. et BOUDET A., 1965 - Sur l'inhibition des enzymes par les tannins des feuilles de Quercus sessilis Ehrh. Inhibition de la β amylase. C. R. Acad. Sci., 260, 4252-4255.

GADAL P., BOUYSSOU H. et BARTHE J.P., 1969 - Recherches sur la biosynthèse des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Purification et étude des propriétés de la 1-phénylalanine-2-cétoglutarate aminotransférase des feuilles de Quercus pedunculata Ehrh. Physiol. vég., 7, N° 1, 69-80.

GADAL P., LAURENS S., MOILLO A. et PAREILLEUX A., 1968 b - Les Zoocécidies du genre Quercus. Etude de leur composition en substances azotées et en acides organiques. Marcellia, 35, N° 4, 225-239.

GADAL P. et SERIS J.L., 1962 - Sur les interactions entre l'acide glyoxylique et les thiols biologiques : cystéine, cystéamine et homocystéine. C. R. Acad. Sci., 254, 1341-1343.

GAMBORG O.L., 1965 - Transamination in plants. The specificity of an amino-transferase from Mung Bean. Canad.J. Biochem., 43, 723-730.

GAMBORG O.L. et KEELY F.W., 1966 - Aromatic metabolism in plants. I. A study of the prephenate deshydrogenase from bean plants. Biochim. Biophys. Acta, 115, 65-72.

GAMBORG O.L. et NEISH A.C., 1959 - Biosynthesis of phenylalanine and tyrosine in young wheat and buckwheat plants. Canad. J. Biochem. Physiol., 37, 1277-1285.

GAMBORG O.L. et SIMPSON F.J., 1964 - Preparation of prephenic acid and its conversion to phenylalanine and tyrosine by plant enzymes. Canad. J. Biochem., 42, 583-591.

GAMBORG O.L. et WETTER L.R., 1963 - An aromatic aminoacid transaminase from Mung Bean. Canad. J. Biochem. Physiol., 41, 1733-1740.

GARRIGUES R., 1951 - Recherches sur les cécidies, le cancer et l'action des carbures cancérigènes sur les végétaux. Thèse Doct. Sci. nat., Lyon.

GIBSON F., 1964 - Chorismic acid : purification and some chemical and physical studies. Biochem. J., 90, 256-261.

GIBSON F., 1968 - Chorismic acid. Biochem. prep., 12, 94-97.

GIBSON F. et PITTARD J., 1968 - Pathways of biosynthesis of aromatic aminoacids and vitamins and their control in microorganisms. Bacteriol. rev., 32, N° 4, 465-492.

GIRTON R.E. et PARK E.R., 1941 - Respiration studies on germinating white oak acorns. Proc. Indian Acad. Sci., 51, 83-86.

GOAS G., 1965 - Utilisation de certaines formes d'azote par les racines isolées et les plantules privées de leurs cotylédons de Pisum sativum. Thèse Doct. Sci. nat., Rennes.

GORTNER W.A. et KENT M.J., 1958 - Coenzyme requirement and enzyme inhibitors of pineapple indoleacetic oxydase. J. Biol. Chem., 233, 731-735.

GREEN D.E., LELOIR L.F. et NOCITO V., 1945 - Transaminases. J. Biol. Chem., 161, 559-582.

GUIRARD B.M. et SNELL E.E., 1964 - Transamination. in Comprehensive Biochemistry, Vol. 15. M. FLORKIN et E.H. STOTZ éd., Elsevier Publishing Company, Amsterdam, Londres et New York, 138-174.

GUITTON Y., 1964 - Métabolisme de l'arginine dans les premiers stades du développement de Pinus pinea L. Thèse Doct. Sci. nat., Toulouse.

GUPTA D.R., MAHAJAN N.C. et GUPTA S.C., 1962 - Paper chromatography of galls of Urtica dioica L. caused by Puccinia carisis Schum. Proc. Indian Acad. Sci., 22, N° 3, 297-299.

HARTIG T., 1843 - Zweiter Nachtrag zur naturgeschichte der Gallwespen. Z. Entomol., 4, 395-422.

HATHWAY D.E., 1958 - Experiments on the origin of oak bark tannin. Biochem. J., 71, 533-537.

HAYASHI S.I., GRANNER D.K. et TOMKINS G.M., 1967 - Tyrosine aminotransferase. J. Biol. Chem., 242, N° 18, 3998-4006.

HELLER R., 1969 - Biologie végétale. II. Nutrition et métabolisme. Masson éd., Paris.

HINDBERG I. et DAM H., 1965 - Seasonal variations of bioquinones and α tocopherol in oak leaves. Physiol. Plant, 18, 838-840.

HOFFEREK H., 1967 - Untersuchungen über Stoffwechsel virus kranker Pflanzen. III. Veränderungen der Stickstoff und Kohlenhydratstoffwechsels bee Phaseolus vulgaris nach Infektion mit den Tabaknecrose Virus. Phytopathol. Z., 58, 141-174.

HOUARD C., 1908 - Les Zoocécidies des plantes d'Europe et du bassin de la Méditerranée. Librairie scientifique A. Hermann éd., Paris.

HULME A.C. et WOOLTORTON L.S.C., 1958 - Determination of the non volatile acids in pome fruits and a study of acids changes in apple during storage. J. Sci, Food Agr., 9, 150-158.

IBRAHIM R.K., LAWSON S.G. et TOWERS G.H.N., 1961 - Formation of labeled sugars from l-tyrosine ^{14}C in some higher plants. Canad. J. Biochem. Physiol., 39, 873-880.

JENSEN R.A. et NESTER E.W., 1965 - The regulatory significance of intermediary metabolites : control of aromatic aminoacid biosynthesis by feedback inhibition in Bacillus subtilis. J. molec. Biol., 12, 468-481.

JONES D.D., 1965 - Banana tannins and its reaction with polyethylene glycols. Nature, 206, 299-300.

KALRA V.K., KUKLA A.S. et SESHADRI T.R., 1966 - A chemical examination of Quercus robur and Quercus incana. Curr. Sci., 35, N° 8, 204-205.

KENNEY F.T., 1959 - Properties of partially purified tyrosine α ketoglutarate transaminase from rat liver. J. Biol. Chem., 234, N° 10, 2707-2712.

KIEFFER J.J., 1897 - Monographie des Cynipides d'Europe et d'Algérie. in Species des Hyménoptères d'Europe et d'Algérie. Vol. VII. E. ANDRE éd., Librairie scientifique A. Hermann Paris.

KIENTZLER L., BRINGAY J. et CIBILLE F., 1962 a - Evolution des substances azotées, des glucides et des acides organiques des feuilles d'Acer pseudoplatanus L. parasitées par Pediaspis aceris Forst. C. R. Acad. Sci., 255, 1467-1469.

KIENTZLER L., KILBERTUS G. et BARADEL M., 1962 b - Modification du métabolisme azoté des feuilles d'Acer campestre attaqué par Eriophyes macrorrhynchus. Bull. Ec. nation. sup. Agr. Nancy, 4, N° 1, 34-39.

KINDL H., SCHOLDA R. et HOFFMANN-OSTENHOF O., 1967 - Untersuchungen über die Biosynthese der Cyclite. XV. Zur Bildung von L- (+) Quercit in Quercus Arten. Phytochemistry, 6, 237-244.

KOSTOFF D. et KENDALL J., 1929 - Studies on the structure and development of certain Cynipid galls. Biol. Bull., 56, 402-458.

KRETOVITCH W.L., 1958 - La biogénèse des acides aminés dicarboxyliques et aromatiques chez les végétaux. Qual. Plant. Materiae vég., III-IV, 79-98.

KRETOVITCH V.L. et GEIKO N.S., 1964 - Sur la teneur des végétaux en acides cétoniques. Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R., 158, N° 2, 471-473.

KUSTENMACHER M., 1894 - Beiträge zur Kentniss der Gallenbildungen mit Berüchsichtigung des Gerbstoffes Jb. Wiss. bot., 26, 82-185.

KÜSTER E., 1903 - Pathologische Pflanzenanatomie. G. Fischer éd., Iéna.

KÜSTER E., 1925 - Pathologische Pflanzenanatomie III. G. Fischer éd., Iéna.

LACAZE-DUTHIERS H., 1853 - Recherches pour servir à l'histoire des galles. Ann. Sci. nat. Bot., 3e série, 19, 273-354.

LANG C.A., 1958 - Simple microdetermination of Kjeldahl nitrogen in biological materials. Anal. Chem., 30, 1692-1694.

LATCHÉ J.C., 1963 - Sur la biosynthèse par transamination de l'alanine, des acides aspartique et glutamique et sur l'existence de la glutamique décarboxylase chez Agaricus hortensis. C. R. Acad. Sci., 257, 499-501.

LAVARENNE-ALLARY S., 1965 - Recherches sur la croissance des bourgeons de Chêne et de quelques autres espèces ligneuses. Ann. Sci. forest., 22, N° 1, 1-203.

LAVARENNE-ALLARY S., 1968 - Croissance comparée des tiges et des racines de jeunes Chênes cultivés en conditions contrôlées. C. R. Acad. Sci., 266, 778-780.

LESAINT C., COÏC Y., CARPENTIER Y. et VAN ASSCHE J., 1964 - Comparaison concernant les acides organiques entre galles de feuilles et feuilles de Bryopphyllum daigremontianum. Ann. Physiol. vég., 6, N° 3, 251-254.

LEWIS I.F. et WALTON L., 1958 - Gall formation on Hamamelis virginiana resulting from material injected by the Aphid Hormaphis hamamelidis. Trans. amer. micr. Soc., 77, 146-200.

LINEWEAVER H. et BURK D., 1934 - Determination of enzyme dissociation constants. J. amer. chem. Soc., 56, 658-666.

LINGENS F., 1968 - Die Biosynthese aromatischer Aminosaüren und deren Regulation. Angew. Chem., 10, 384-394.

LINGENS F., GOEBEL W. et UESSELER H., 1966- Regulation der Biosynthese der aromatischen Aminosaüren in Saccharomyces cerevisiae. I. Hemmung der Enzymaktivitäten. Biochem. Z., 346, 357-367.

LINGENS F., GOEBEL W. et UESSELER H., 1967 a - Regulation der Biosynthese der aromatischen Aminosaüren in Claviceps paspali. Europ. J. Biochem., 2, 442-447.

LINGENS F., GOEBEL W. et UESSELER H., 1967 b - Regulation der Biosynthese der aromatischen Aminosaüren in Saccharomyces cerevisiae. II. Repression, Induktion und Aktivierung. Europ. J. Biochem., 1, 363-374.

LIPS H.S. et BEEVERS H., 1966 - Compartimentation of organic acids in corn roots. I. Differential labeling of 2 malate pools. Plant Physiol., 41, 709-712.

LORENCE J.H. et NESTER E.W., 1967 - Multiple molecular forms of chorismate-mutase in Bacillus subtilis. Biochemistry, 6, N° 5, 1541-1553.

LOWRY D.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., 1951 - Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.

LUND A.P. et SANDSTROM W.M., 1943 - The proteins of various tree seeds. J. agric. Res., 66, N° 9, 349-355.

LUPPI A.M. et GAUTERO C., 1967 - Ricerche sulle micorrhize di Quercus robur, Quercus petraea, e Quercus pubescens in Piemonte. Allionia, 13, 129-148.

Mc CALLA D.R. et NEISH A.C., 1959 - Metabolism of phenylpropanoïd compounds in Salvia. I. Biosynthesis of phenylalanine and tyrosine. Canad. J. Biochem. Physiol., 37, 531-536.

MAGNUS W., 1914 - Die Entstehung der Pflanzengallen verursacht durch Hymenoptera. G. Fischer éd., Iéna.

MALPIGHI M., 1675 - Opera omni de Gallis. Londini 2 (cité par KIEFFER, 1897).

MANI M.S., 1964 - Ecology of plant galls. W. Junk éd., La Hague.

MARESQUELLE H.J. et MEYER J., 1965 - Physiologie et morphogénèse des galles d'origine animale (Zoocécidies). Encycl. Plant Physiol., 15, N° 2, 280-329.

MARIGO G., 1970 - Contribution à l'étude de la biosynthèse des acides phénoliques chez Quercus pedunculata Ehrh. Thèse Doct. Spécialité (Physiologie Végétale), Toulouse.

MARIGO G. et ALIBERT G., 1969 - Recherches sur la biosynthèse des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs : mise en évidence des acides α-résorcylique, homoprotocatéchique et phtalique dans les feuilles de Quercus pedunculata. C. R. Acad. Sci., 269, 1963-1965.

MAROC J., 1967 - La biogénèse d'isomères de l'acide tartrique à partir de L-sorbose U^{14}C, de glycolate 1-^{14}C et de glucose U^{14}C. Physiol. vég., 5, N° 1, 47-55.

MAROC-GYR J., 1965 - Le métabolisme du glucose et du gluconate dans les feuilles de Pelargonium zonale L. en relation avec la formation d'acides organiques en particulier de l'acide tartrique. Physiol. vég., 3, N° 2, 167-180.

MAYR G.L., 1876 - Die Europaeischen Cynipiden-gallen mit Ausschluss der auf Eichen vorkommenden Arten. Jahresb. der Wiener Kommunal Oberrealschule inder Rossau. 15, 1-24.

MEISS A.N., 1952 - The formation of asparagine in etiolated seedlings of Lupinus albus. The Connecticut agricultural Experiment station New Haven Bull., N° 553.

MEISTER A., 1955 - Transamination. Adv. in Enzymol., 16, 185-246.

MEISTER A., 1962 - Amino group transfer. in The Enzymes. P.D. BOYER, H. LARDY et K. MYRBACK éd., Academic press, New York, London, 193-217.

MICHALSKI L., 1969 - Content of plant growth regulators in the developping seeds of oak (Quercus robur L.). Acta Soc. Bot. Pol., 38, N° 1, 157-163.

MINAMIKAWA T. et URITANI I., 1967 - 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthase in sweet potato roots. J. Biochem. Jap., 61, 367-372.

MOILLO A., 1968 - Résultats non publiés.

MOLLIARD M., 1913 - Recherches physiologiques sur les galles. Rev. gén. Bot., 25, 225-252, 285-307, 341-370.

MOLLIARD M., 1917 - Production artificielle d'une galle. C. R. Acad. Sci., 165, 160-162.

MONTANT C., 1960 - Modification du métabolisme azoté des feuilles de Rhododendron ferrugineum attaquées par Exobasidium rhododendri Cram. et Eriophyes alpestris Wal. Bull. Soc. Fr. Physiol. vég., 6, N° 2, 85-86.

MOREL G. et DURANTON H., 1959 - Le métabolisme de l'arginine par les tissus végétaux. in Memorial Claude Fromageot Masson éd., Paris, 475-483.

NAIR P.M. et VINING L.C., 1965 - Phenylalanine hydroxylase. Phytochemistry, 4, 401-411.

NESTER E.W., LORENCE J.H. et NASSER D.S., 1967 - An enzyme aggregate involved in the biosynthesis of aromatic aminoacids in Bacillus subtilis. Its possible function in feedback regulation. Biochemistry, 6, N° 5, 1553-1562.

NEWCOMB E.H., 1951 - Comparative studies of metabolism of insect galls and normal tissues. in Plant growth substances. F. SKOOG éd., University of Wisconsin press. 417-427.

NYSTERAKIS F., 1946 - Nouvelle interprétation de la formation des cécidies. C. R. Acad. Sci., 222, 1133-1134.

OAKS A. et BIDWELL R.G.S., 1970 - Compartimentation of intermediary metabolites. Annu. rev. Plant Physiol., 21, 43-66.

O'NEIL S.R. et De MOSS R.D., 1968 - Tryptophan transaminase from Clostridium sporogenes. Arch. Biochem. Biophys. 127, 361-369.

PACLT J. et HASSLER J., 1967 - Concentration of nitrogen in some plant galls. Phyton Autr., 12, N° 1-4, 173-176.

PANTANELLI E., 1911 - Danni di Thrips sulle vite americane. Staz. sper. agr. ital., 44.

PARIS G. et TROTTER A., 1911 - Sui composti azotati nelle galle Neuroterus baccarum. Marcellia, 10, 150-159.

PETERSON E.A. et SOBER H.A., 1962 - Column chromatography of proteins : substitued celluloses. in Methods in Enzymology, Vol. V, S.P. COLOWICK et N.O. KAPLAN éd., Academic press, New York, London, 3-27.

PLIENINGER H., 1962 - Prephenic acid : properties and the present status of its synthesis. Angew. Chem., 1, N° 7, 367-371.

RÄDER-ROITZSCH J.E., 1958 - Untersuchungen über die Stoffwanderung im Keimungs verlauf von Quercus pedunculata Ehrh. Forstwissensch Cbl., 77, 109-117.

REAUMUR R.A., 1737 - Mémoires pour servir à l'histoire des insectes. II et III. Paris.

RED'KINA T.V., USPENSKAJA J.V. et KRETOVITCH V.L., 1969 - (En russe) Purification and properties of plant L-glutamate-phenylpyruvate aminotransferase. Biokhimija S.S.S.R., 34, 312-324.

REY L., 1967 - La galle de Biorhiza aptera Bosc. sur la racine de Quercus pedunculata Ehrh. Observation de la ponte et des premières réactions de l'hôte. C. R. Acad. Sci., 264, 2891-2894.

REY L., 1969 - Les premiers stades de développement de la galle de Biorhiza pallida Ol. Marcellia, 36, N° 1-2, 119-135.

RIBEREAU-GAYON P., 1968 - Les composés phénoliques des végétaux. Dunod éd., Paris.

ROUX L. et LESAINT C., 1959 - Mise au point d'une technique de détermination des acides organiques chez les végétaux. Ann. Physiol. vég., 1, 83-91.

RUDMAN D. et MEISTER A., 1953 - Transamination in Escherichia coli. J. Biol. Chem., 200, 591-604.

SALGUES P., 1959 - La chimie des galles et les enseignements qui s'en dégagent. Qual. Plant.Materiae vég., 5, 268-282.

SAMPSON A.W. et SAMISCH R., 1935 - Growth and seasonal changes in composition of oak leaves. Plant Physiol., 10, 739-751.

SANWAL B.D., ZINK M.W. et DIN G., 1964 - Transaminases and racemases. in Modern methods of plant analysis, Vol. 7, K. PAECH et M.V. TRACEY éd., Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, 361-391.

SCANDURRA R., CANELLA C. et FERRETTI M.G., 1967 - L-glutamate-phenylpyruvate aminotransferase. I. Purification of the enzyme. Europ. J. Biochem., 3, N° 2, 219-223.

SCHMIT J.C. et ZALKIN H., 1969 - Chorismate-mutase prephenate dehydratase. Partial purification and properties of the enzyme from Salmonella typhimurium. Biochemistry, 8, 174-181.

SCHNEIDER A., 1964 - Déterminisme du cycle de Taphrina deformans (Ascomycète) en rapport avec l'évolution des acides organiques chez le Pêcher. Thèse Doct. Sci. nat., Toulouse.

SCHNETZLER J.C., 1963 - La croissance hivernale de la galle de Neuroterus quercus-baccarum ♀♀ (N. lenticularis Ol.) et sa stimulation par l'hétéro-auxine. Marcellia, 31, 1-34.

SILBERT D.F., JORGENSEN S.E. et LIN E.C.C., 1963 - Repression of transaminase A by tyrosine in Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta, 73, 232-240.

SINHA S.K., SIRONI G.S. et ABROL Y.P., 1967 - Studies on phenylpyruvate transaminase in plant tissues homogenates. Indian J. exper. Biol., 5, 190-191.

SMITH I., 1960 - Chromatographic and electrophoretic techniques. Interscience Publishers New York. Vol. I.

SPRINSON D.B., 1960 - The biosynthesis of aromatic compounds from D-glucose. Adv. Carbohyd. Chem., 15, 235-270.

STEWARD F.C. et DURZAN D.J., 1965 - Metabolism of nitrogenous compounds. in Plant Physiology , Vol. IV a, F.C. STEWARD éd., Academic press, New York, London, 379-706.

STRAUB F.B., 1936 - Quantitative Methoden zur Untersuchung der Fumarsaürekatalyse. Z. Physiol. Chem., 244, 117-127.

TAVANT H., 1967 - Fixation de $^{14}CO_2$ et absorption du glucose U^{14}C par des feuilles de Begonia semperflorens Link. et Otto. Etudes des conditions de la genèse de l'acide oxalique. Physiol. vég., 5, N° 1, 57-69.

TAYLOR S.H., 1949 - Initiation and development of the gall of Aulax glechomae on Nepeta hederacea. Amer. J. Bot., 36, 222-230.

TISELIUS A., HJERTEN S. et LEVIN O., 1956 - Protein chromatography on calcium phosphate columns. Arch. Biochem. Biophys., 65, 132-155.

TOUZÉ A., 1964 - L'anthracnose du Melon. Etude de quelques manifestations physiologiques. Thèse Doct. Sci. nat., Toulouse.

USPENKAJA Z.V., KRETOVITCH V.L. et KASHKARAEVA K.I., 1964 - Enzymatic transamination of phenylpyruvic in plants. Traduit de Biokhimija, S.S.S.R., 30, N° 4, 790-800.

VELICK S.F. et VAVRA J., 1962 - Glutamic-oxalacetic transaminase. in The Enzymes. P.D. BOYER, H. LARDY et K. MYRBACK éd., Academic press, New York, London, 219-246.

WARICK R.P. et HILDEBRANDT A.C., 1966 - Free aminoacids contents of stem and Phylloxera gall tissue cultures of grape. Plant Physiol., 41, N° 4, 573-578.

WARICK R.P. et HILDEBRANDT A.C., 1967 - Sugar contents of single cell clones of stem and Phylloxera leaf galls of the grape vine. Nature, 213, N° 5072, 210-211.

WEBER H.L. et BOCK A., 1969 - Regulation of the chorismic acid branch point in aromatic acid synthesis in blue-green and green algae. Arch. Mikrobiol., 66, 250-258.

WILSON D.G., KING K.W. et BURRIS R.H., 1954 - Transamination reaction in plants. J. Biol. Chem., 208, 863-874.

WOODS F.W., HARRIS H.C. et CALDWELL R.E., 1959 - Monthly variations of carbohydrates and nitrogen in roots of sandhill oaks and wiregrass. Ecology, 40, N° 53, 292-295.

YOSHIDA S., 1969 - Biosynthesis and conversion of aromatic aminoacids in plants. Annu. Rev. Plant Physiol., 20, 41-62.

YOSHIDA S. et TOWERS G.H.N., 1963 - Synthesis of shikimic acid C^{14} in Pinus resinosa Ait. from some C^{14} labelled compounds. Canad. J. Biochem. Physiol., 41, 579-586.

ZENK M.H., 1966 - Biosynthesis of C_6-C_1 compounds. in Biosynthesis of aromatic compounds. G. BILLEK éd., Pergamon press, Oxford, London, Edinburgh, New York, Toronto, Paris, Braunschweig, 45-60.

ABBREVIATIONS

DAHP	:	Acide 7-phospho-3-désoxy-D-arabino-heptulosonique
NAD	:	Nicotinamide-dinucléotide
NADP	:	Nicotinamide-dinucléotide-phosphate
GPPT	:	Glutamique-phénylpyruvique transaminase
GOT	:	Glutamique-oxalacétique transaminase
Asp NH_2	:	Asparagine
Glu NH_2	:	Glutamine
Ser	:	Sérine
Glu	:	Acide glutamique
Asp	:	Acide aspartique
Ala	:	Alanine
Arg	:	Arginine
Pro	:	Proline
Lys	:	Lysine
His	:	Histidine
Gly	:	Glycocolle
Thr	:	Thréonine
Val	:	Valine
Ile	:	Isoleucine
Tyr	:	Tyrosine
Phe	:	Phénylalanine
Try	:	Tryptophane